

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACOLÓGICAS



CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO MOLECULAR E
MORFOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÉNERO *DIGITALIS* L.

Joana Vanessa Sousa da Silva

Mestrado em Medicamentos à Base de Plantas

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACOLÓGICAS



CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO MOLECULAR E
MORFOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÉNERO *DIGITALIS* L.

Joana Vanessa Sousa da Silva

Dissertação orientada pelas Professoras
Doutora Rita Maria Olivença Trindade dos Santos Serrano
Doutora Olga Maria Duarte Silva

Mestrado em Medicamentos à Base de Plantas

2012

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Rita Maria O. T. S. Serrano da FFUL (Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa), investigadora do iMed.UL (Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences), pela sua orientação, motivação e ajuda, assim como no esclarecimento de dúvidas e apoio.

À Professora Doutora Olga Maria D. Silva da FFUL, investigadora do iMed.UL, pelas suas críticas construtivas, exigência e experiência.

À Engenheira Doutora Filomena de Sousa Nóbrega da Unidade de Silvicultura e Produtos Florestais, do INRB (Instituto Nacional dos Recursos Biológicos), pelo carinho, acompanhamento, ensinamentos e disponibilização do equipamento para a realização da técnica de PCR, no fornecimento dos *primers* e na construção dos cladogramas.

Ao Dr. Telmo, do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências, da Universidade de Lisboa, pelo apoio técnico prestado na utilização do Microscópio Eletrónico de Varrimento.

À Dr.^a Sofia Frazão, que iniciou este Projeto de investigação no âmbito do seu estágio de Licenciatura, no Laboratório de Farmacognosia da FFUL, pelo fornecimento de dados e imagens obtidos no estudo morfológico por si realizado, que foram fundamentais para a continuação e realização deste trabalho.

A toda a equipa de investigação do Laboratório de Farmacognosia da FFUL.

Ao colega Gustavo, pela ajuda, carinho e amizade nos momentos mais difíceis, um grande obrigado.

Aos colegas do Mestrado em Medicamentos à Base de Plantas da FFUL, pela ajuda e motivação ao longo destes dois anos.

Aos meus pais, por todo o esforço que têm feito para me manter a estudar estes anos, pela força e ânimo que me deram, pelos conselhos e incentivos para terminar esta etapa.

À minha amiga Vânia, por todo o carinho, amizade e disponibilidade para me ajudar nos momentos mais difíceis e também pela motivação e aconselhamento.

Ao Sr. Moreira e à D.^a Cidália, pelo carinho e motivação, e à sua neta Leonor, pelos bons momentos de distração e brincadeira.

Por fim, quero agradecer a todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas	viii
I – Abordagem Morfológica	
1.1 Enquadramento e Objetivos	1
1.2 Importância das Plantas Medicinais	2
2. Revisão Bibliográfica	
2.1 O género <i>Digitalis</i> L.,	6
2.2 Enquadramento Taxonómico.....	7
3. A Hibridação nas Plantas	13
4. A Hibridação no género <i>Digitalis</i> L.,	14
5. Material e Métodos	
5.1 Material Vegetal	16
5.2 Métodos	16
5.2.1 Análise macroscópica.....	16
5.2.2 Análise microscópica.....	17
5.2.3 Análise de dados.....	18
6. Resultados	18
6.1 <i>Digitalis purpurea</i> L.,	19
6.2 <i>Digitalis thapsi</i> L.,	24
6.3 Híbrido,	29
7. Discussão	40
II- Abordagem Molecular	
2.1 Evolução da Biologia Molecular.....	46
2.2 Marcadores Moleculares	47
2.3 Marcadores RAPD	48
2.4 Aplicação de marcadores RAPD no género <i>Digitalis</i> L.,	49
3. Material e Métodos	
3.1 Material vegetal.....	51
3.2 Extração de ADN genómico	51
3.3 Amplificação de ADN por PCR	51

3.4 Amplificação por RAPD	51
3.5 Eletroforese de ADN em gel de Agarose	53
3.6 Análise dos géis	53
3.7 Análise de dados.....	54
4. Resultados	55
5. Discussão	59
Conclusões e Perspectivas	60
Referências.....	63
Anexo A	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de <i>Digitalis purpurea</i> L.,	6
Figura 2 - <i>Digitalis purpurea</i> L.,.....	9
Figura 3 - Estrutura química da Digoxina e da Digitoxina	11
Figura 4 - <i>Digitalis thapsi</i> L.,	11
Figura 5 - Distribuição geográfica de <i>Digitalis purpurea</i> L. e <i>Digitalis thapsi</i> L. em Portugal continental.....	12
Figura 6 - <i>D. purpurea</i> L. folha (Lupa).....	21
Figura 7 - <i>D. purpurea</i> L. flor (Lupa)	21
Figura 8 - <i>D. purpurea</i> L. folha (MO).....	22
Figura 9 - <i>D. purpurea</i> L. tricomas (MO)	23
Figura 10 - <i>D. purpurea</i> L. (MEV)	23
Figura 11 - <i>D. thapsi</i> L. folha (Lupa)	26
Figura 12 - <i>D. thapsi</i> L. flor (Lupa)	26
Figura 13 - <i>D. thapsi</i> L. folha (MO)	27
Figura 14 - <i>D. thapsi</i> L. tricomas (MO)	28
Figura 15 - <i>D. thapsi</i> L. (MEV)	28
Figura 16 - Híbrido folha (Lupa).....	31
Figura 17 - Híbrido flor (Lupa).....	31
Figura 18 - Híbrido folha (MO).....	32
Figura 19 - Híbrido tricomas (MO)	33
Figura 20 - Híbrido (MEV).....	33
Figura 21 - Comparação estatística da espessura média da cutícula	36
Figura 22 - Comparação estatística da razão comprimento / largura média	36
Figura 23 - Comparação estatística do índice estomático.....	37
Figura 24 - Comparação estatística da espessura média do parênquima em paliçada e lacunoso.....	37
Figura 25 - Comparação estatística do comprimento pedicelar médio.....	39
Figura 26 - Tina de eletroforese.....	53

Figura 27 - Aparelho VersaDoc	53
Figura 28 - Perfil RAPD-PCR com o <i>primer</i> OPA-10	56
Figura 29 - Perfil RAPD-PCR com o <i>primer</i> OPB-7	56
Figura 30 - Dendograma para o <i>primer</i> OPB-7	58
Figura 31 - Dendograma da junção dos dois <i>primers</i>	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação sistemática do género <i>Digitalis</i> L.,	8
Tabela 2 - Divisão do género <i>Digitalis</i> L. segundo as Floras Nacionais	9
Tabela 3 - Características macroscópicas	34
Tabela 4 - Parâmetros da anatomia foliar médios	35
Tabela 5 - Tipos de tricomas.....	38
Tabela 6 - Dimensões médias para os tricomas	39
Tabela 7 - Primers utilizados e suas sequências nucleotídicas	52
Tabela 8 - Componentes e volumes das misturas reacionais	52
Tabela 9 - Programa de PCR.....	53
Tabela 10 - Lista de <i>primers</i> e bandas correspondentes.....	57

ABREVIATURAS E SIGLAS

DP - *Digitalis purpurea* L.

DT - *Digitalis thapsi* L.

H - híbrido

Cél. - células

Ep. - epiderme

Sup. - superior

Inf. - inferior

Pág. - página

C - comprimento

L - largura

C/L - razão comprimento largura

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD - Polimorfismo de ADN Amplificado Aleatoriamente

pb - pares de bases

OTU - Unidade Taxonómica Operacional

µm - micrómetros

µM - micromolar

µl - microlitros

Fig. - figura

MO – Microscópio óptico

MEV- Microscópio electrónico de varrimento

RESUMO

O presente trabalho visa comprovar a hibridação natural entre *Digitalis thapsi* L. (endemismo ibérico) e *Digitalis purpurea* L. por meio de técnicas morfológicas e moleculares.

Procedeu-se à caracterização morfológica através da microscopia ótica e eletrónica de varrimento e à análise molecular, através da técnica RAPD-PCR, sendo os resultados obtidos submetidos a tratamento estatístico usando para o efeito técnicas e programas informáticos adequados - SPSS e NTSYS-pc.

Os resultados da análise macroscópica mostraram, terem os exemplares híbridos, folha e corola morfológicamente semelhantes às de *D. thapsi*, e cálice floral similar ao de *D. purpurea*. A corola destes exemplares híbridos é de coloração intermédia entre as duas espécies (*D. thapsi* e *D. purpurea*), tendo também os dois tipos de máculas característicos destas espécies sido observados nestes.

A nível microscópico, os exemplares híbridos observados mostraram ter: a cutícula das células epidérmicas das folhas e flores e o tipo e forma dos tricomas secretores, semelhante aos observados em *D. thapsi*; e o tipo e forma dos tricomas tectores e número de camadas de células do parênquima lacunoso foliar semelhantes aos de *D. purpurea*. O parênquima em paliçada dos exemplares híbridos observados tem um número de camadas celulares intermédio entre as duas espécies (*D. thapsi* e *D. purpurea*).

A observação e tratamento dos dados moleculares obtidos por RAPD-PCR mostrou terem os exemplares híbridos e *D. thapsi* um perfil molecular muito semelhante, sendo evidente a predominância dos caracteres desta espécie (*D. thapsi*) nestes, permitindo assim concluir serem os exemplares observados um híbrido *D. thapsi* x *D. purpurea*.

Palavras-chave: *Digitalis purpurea* L.; *Digitalis thapsi* L.; hibridação; microscopia; RAPD-PCR; híbrido (*D. thapsi* L. x *D. purpurea* L.)

ABSTRACT

The aim of this work was to confirm the natural hybridization between *Digitalis thapsi* (Iberian endemism) and *Digitalis purpurea* L. by means of morphological and molecular techniques.

Proceeded to the morphological characterization by optical microscopy and scanning electronic and molecular analysis by RAPD-PCR, and the results analyzed statistically using for this purpose appropriate techniques and software - SPSS and NTSYS-pc.

Macroscopic results revealed that the hybrid presents leaves and corolla similar to *D. thapsi* and floral cup similar to *D. purpurea*. Hybrid corolla appeared to be intermediate color and the two types of stains found in other species. The corolla of exemplary hybrid is intermediate in color between the two species (*D. thapsi* and *D. purpurea*), and also the two types of stains characteristic of these species were observed in these. At microscopic level, the samples proved to be hybrids observed: the cuticle of the epidermal cells of leaves and flowers and the type and form of secretory trichomes, similar to those observed in *D. thapsi*, and the type and shape of trichomes and number of layers of spongy parenchyma cells leaf similar to *D. purpurea*. The palisade parenchyma of the hybrid specimens have seen a number of cell layers intermediate between the two species (*D. purpurea* and *D. thapsi*).

The observation and treatment of molecular data obtained by RAPD-PCR showed the specimens were hybrids and *D. thapsi* a molecular profile very similar, with a clear predominance of the characters of this specie (*D. thapsi*) in these, thus completing the specimens were observed a hybrid *D. thapsi* x *D. purpurea*.

Keywords: *Digitalis purpurea* L.; *Digitalis thapsi* L.; hybridization; microscopy; RAPD- PCR; hybrid (*D. thapsi* L. x *D. purpurea* L.)

I – Abordagem Morfológica

1.1 Enquadramento e objetivos

O género *Digitalis* L., pertencente à família Plantaginaceae (KOLE, 2011), compreende cerca de 20 espécies que se distribuem pela Bacia Mediterrânica e Europa Central (PÉREZ-ALONSO *et al.*, 2009; CASTROVIEJO, 2009).

As plantas pertencentes a este género são plantas herbáceas bianuais ou perenes, cujas folhas se encontram dispostas alternadamente ao longo do caule, formando-se rosetas de folhas na parte basal. Apresentam flores zigomórficas dispostas em racemos bracteados e a sua cor varia de acordo com a espécie, podendo ser púrpura, rosa, branco e amarelo. O cálice é pentalobado e mais curto que a corola. A corola é tubulosa, constricta na base, e o limbo apresenta-se dividido em dois lábios, sendo o superior geralmente menor que o inferior (AKHATAR, 1993; KOLE, 2011).

Este género ocupa um lugar de destaque entre as plantas com utilidade medicinal, tendo sido alvo de investigação desde o século XVII. Este interesse surgiu com Whitering, que associou o uso de *Digitalis purpurea* L. ao tratamento da insuficiência cardíaca. Este fato deve-se a que todas as espécies deste género possuem, em maior ou menor quantidade, diversos heterósidos cardiotónicos, vulgarmente conhecidos por digitálicos. Atualmente, algumas destas espécies, como *Digitalis purpurea* L. e *Digitalis lanata* Ehrh., são utilizadas na terapêutica como fonte para a obtenção de princípios ativos (CASTROVIEJO, 2009).

Em Portugal, são reconhecidas apenas duas espécies deste género, *Digitalis purpurea* L. e *Digitalis thapsi* L. (endémica da Península Ibérica), ambas espontâneas. No entanto, de acordo com a Farmacopeia Portuguesa, a única espécie reconhecida pelos seus fins medicinais é a *Digitalis purpurea* L. (COSTA, 2002).

Existem zonas a norte de Portugal onde as duas espécies coexistem, sendo aparente a possibilidade de hibridação natural. Nestas zonas, foram encontrados exemplares, *Digitalis* sp., cujas características macroscópicas

intermédias não permitem a sua identificação como uma das espécies anteriores.

Este trabalho visa complementar o trabalho experimental já realizado no Laboratório de Farmacognosia da FFUL (SERRANO *et al.*, 2004; SERRANO *et al.*, 2006; FRAZÃO *et al.*, 2008) inerente ao estudo morfológico de cerca de trinta exemplares de *D. purpurea* L. e *D. thapsi* L., previamente identificados com a Flora de Portugal, e de exemplares considerados híbridos. Neste sentido, proceder-se-á à análise estatística dos resultados já obtidos.

Simultaneamente, pretende-se confirmar a hibridação natural entre as duas espécies, através de caracteres macroscópicos e microscópicos e de técnicas moleculares.

Pretende-se contribuir para aprofundar o conhecimento científico de plantas medicinais da Flora portuguesa, contendo classes químicas de constituintes com atividade farmacológica reconhecida. Este exemplar do género *Digitalis* poderá ter importância como potencial fonte alternativa de compostos digitálicos.

Este estudo realça a importância de Portugal como território de elevada biodiversidade, contribuindo com informação relevante para a conservação de um património genético que é necessário proteger.

1.2 Importância das plantas medicinais

O conhecimento sobre as plantas acompanhou desde sempre a evolução do Homem através dos tempos. As primeiras civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram o seu potencial curativo (CUNHA, 2009). A sua utilização com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VALDIR, 2005).

Os registos históricos referem o uso de plantas medicinais, em diferentes partes do globo, desde a China, Grécia, Índia, Roma, até ao Médio Oriente (FOWLER, 2006).

O uso de plantas foi particularmente significativo na China, onde um dos mais antigos “herbalistas” conhecidos, Shen Nung (2800 A.C.), descreveu 350 plantas medicinais, na “Divine Husbandman's Materia Medica”, considerada a mais antiga Farmacopeia chinesa. Os ideogramas sumérios datados de 2500 A.C., fornecem igualmente detalhes do uso de uma série de plantas pelas suas propriedades medicinais, fazendo já menção ao ópio, que constitui hoje uma fonte para os mais potentes analgésicos, na indústria farmacêutica atual (FOWLER, 2006).

Consideram-se também como os primeiros documentos escritos, as placas de barro, atualmente conservadas no “British Museum”, onde se encontram copiados, documentos sumérios e babilônicos. Na Babilónia cerca de 1728 a 1686 A.C., o Rei Hammurabi elaborou o chamado “Código de Hammurabi”, que continha alguns produtos vegetais, sendo estes reconhecidos até a atualidade, como o ópio, o galbano, a assafetida e o meimendro (CUNHA *et al.*, 2007). Existem igualmente registos da utilização de plantas medicinais na Síria e no Egito, que datam de 1500 A.C. e na Índia, cerca de 1500 a 1400 A.C., bem como do uso extensivo de plantas medicinais no norte e sul da América, por indígenas (FOWLER, 2006).

Um outro documento importante foi o papiro, decifrado pelo alemão Georg Ebers em 1873, que se revelou o primeiro tratado médico egípcio conhecido, da primeira metade do século XVI, antes da era cristã, em que parte do seu texto era destinado à descrição de algumas doenças internas e a restante dava indicações sobre a constituição dos medicamentos a empregar, no tratamento das mesmas (CUNHA *et al.*, 2007).

Relativamente a civilizações mais recentes é de destacar o contributo dos povos helénicos, através de Hipócrates, considerado o “pai da medicina”, de Galeno, que publicou uma coletânea de fitopreparações medicamentosas, chamadas ainda hoje de preparações “galénicas”, e de Teofrasto, responsável pela “Historia das Plantas” com descrições botânicas precisas, fazendo menção aos efeitos tóxicos e propriedades curativas (GARRET & SILVA, 1997).

Posteriormente surge o grego Dioscórides, autor da obra “De Materia Medica”, usada como guia de estudo pelos árabes e romanos, continuando em vigor até

finais da Idade Média, na qual se descrevem vários produtos de origem animal, vegetal e mineral, com indicações sobre o seu uso médico (FREQUEST, 2003). Durante a Idade Média há um período de estagnação, verificando-se mesmo um retrocesso na cura das doenças. Aliás, durante os séculos XII ao XVII, os livros de Galeno e Avicena, foram praticamente os únicos guias utilizados em terapêutica no ocidente (GARRET & SILVA, 1997). Durante este período a preocupação fundamental, era a identificação botânica das plantas medicinais, a sistematização destas e a preparação de misturas de extratos vegetais, cada vez mais elaborados. Até que, durante o período da Renascença, na primeira parte do século XVI surge Paracelso, que ousou contestar o sistema polifarmacêutico galênico. No entanto, só no século XVIII é que as ideias de Paracelso foram aplicadas com os progressos da química e a aplicação do método experimental ao estudo da biologia. Em finais deste século, inicia-se o isolamento de substâncias ativas dos extratos de plantas medicinais, responsáveis pela sua ação (FREQUEST, 2003).

O primeiro princípio ativo isolado foi a morfina, por Serturner em 1806, seguida da cinchonina por Bernardino António Gomes, da nicotina por Posselt e Reiman, da quinina por Heyningen, entre muitos outros (FREQUEST, 2003). Muitos foram os progressos que ocorreram nos anos seguintes, pois após conseguido o isolamento das substâncias ativas a partir das plantas, deu-se início à síntese química de estruturas novas e similares às encontradas previamente na Natureza. Para esta nova orientação contribuíram os trabalhos de Claude Bernard, ao permitirem a verificação da atividade de muitos produtos naturais, ou dos seus constituintes, para além de possibilitar um conhecimento mais profundo do seu modo de atuação (CUNHA *et al.*, 2007).

Com o isolamento dos constituintes dotados de ação farmacológica, entra-se numa nova fase da utilização científica das plantas medicinais com a substituição progressiva destas e dos seus extratos, pelos compostos reconhecidos como responsáveis pela sua ação farmacológica (CUNHA, 2009). Após um período em que a síntese química trouxe grandes avanços na produção de novos medicamentos, tem-se assistido novamente a um crescente interesse pelas plantas medicinais. O uso de plantas medicinais para a prevenção, tratamento e cura das mais diversas patologias tem aumentado consideravelmente em todo o mundo (CIRIGLIANO & SUN, 1998). Vivemos

atualmente numa época de renascimento dos produtos naturais (JÚNIOR, 2005).

As plantas medicinais e os seus usos por parte das populações têm despertado o interesse de vários investigadores. Entre os fatores que têm contribuído para o aumento das investigações está a comprovada eficácia de várias substâncias com origem nas plantas, bem como muitas dessas plantas constituírem uma fonte de matéria-prima para a síntese de novos fármacos (FOGLIO, 2006).

Para além da importância que desempenham na medicina tradicional de vários povos, o contributo das plantas medicinais para a obtenção de medicamentos é inestimável, sendo que muitos desses fármacos têm vindo a ser amplamente utilizados na medicina ocidental para o tratamento de várias doenças.

Tendo em conta que existem cerca de 400 mil espécies vegetais existentes no planeta e que apenas 62 mil foram estudadas do ponto de vista químico, muito há ainda por descobrir...

2. Revisão bibliográfica

2.1 O género *Digitalis* L.

As primeiras referências ao uso da dedaleira (Fig.1) encontram-se em receitas de monges irlandeses, que as teriam escrito em língua celta, por volta de 1250. Porém, é com Leonardo Fuchs, em 1542, que o nome *Digitalis* surge pela primeira vez, no seu livro “De Historia Stirpium”, com uma gravura da planta (Da GRAÇA, 1967).

Em 1650 aparece já inscrita na Farmacopeia de Londres, considerando-se a primeira publicação (Da GRAÇA, 1967).

Nicolas Lemery em “Dictionaire ou Traité Universel des Drogues Simples” de 1727, chama-lhe *Digitalis purpurea vulgaris*, Park. descrevendo a sua

aplicação como “detersiva” e pouco laxativa. Lewis, em 1775, recomenda o uso tópico das folhas em tumores escrofulosos e, internamente, na epilepsia, referindo que causa vômito e diarreia (Da GRAÇA, 1967).

Os extratos de dedaleira foram utilizados durante muitos séculos, mas foi com o aparecimento da obra de William Withering, um médico e botânico inglês, que lhe é atribuída uma aplicação farmacológica correta. Em 1785 publicou uma monografia “An account of the fox-glove and some of its medicinal uses: with practical remarks on dropsy and other diseases”, onde refere os efeitos clínicos de um extrato de *Digitalis purpurea* sobre o coração, propondo que a planta poderia ser um importante medicamento para a hidropsia, advertindo para a sua toxicidade (ARONSON, 1987).

Após um período de alguma estagnação, em 1799, Ferriar realçou a ação específica sobre o coração, afirmando que ela constituía em regular o pulso e



Figura 1 - Ilustração de *Digitalis purpurea* L. (1885).^[1]

Vulpian, um fisiologista francês, demonstrou em 1855, que a dedaleira causava uma contratura sistólica do coração em rãs (Da GRAÇA, 1967).

Durante alguns anos, vários pesquisadores tentaram isolar os constituintes responsáveis pela ação da planta, mas foi Nativelle, em 1867 que obteve o primeiro, a digitalina. Em 1922, já tinham sido descobertos quatro compostos da dedaleira: digitoxina, digitonina, *Digitalinum verum* e anidrogitalina ou gitoxina. Foi Windaus quem procurou estabelecer as relações químicas existentes entre os diferentes compostos (Da GRAÇA, 1967).

Os trabalhos de Stoll, 1927, que permitiram isolar heterósidos puros, representam um marco importante na investigação dos compostos de *D. purpurea*. Outros investigadores dão continuidade ao estudo de heterósidos em outras espécies de *Digitalis* (Da GRAÇA, 1967).

No âmbito nacional, João Rodrigues Castelo Branco foi quem primeiro fez referência à dedaleira, por volta de 1553, e uma das mais antigas descrições morfológicas de exemplares portugueses deve-se a Grisley, 1789, e a Avellar Brotero em “Flora Lusitanica”, 1804, que descreve *D. purpurea* e *D. thapsi* (Da GRAÇA, 1967).

A “Pharmacopea Naval, e Castrense” de 1819, refere algumas propriedades medicinais da planta, como “anti-epiléticas, anti-escrofulosas, anti-hidrópicas, diuréticas, desobstruentes, eméticas” (Da GRAÇA, 1967).

Por fim, é curioso encontrar algumas referências à dedaleira em obras de escritores portugueses, que mencionam a planta pela sua beleza ou como medicamento (Da GRAÇA, 1967).

2.2 Enquadramento taxonómico

O género *Digitalis* L. foi, pela primeira vez, descrito por Lineu em 1753, que reconheceu cinco espécies (BRAÜCHLER, 2004). Atualmente, este género compreende cerca de 20 espécies (PÉREZ-ALONSO *et al.*, 2009), que se encontram distribuídas pela Bacia Mediterrânica e Europa central, com dois centros de diversidade, a ocidente e a oriente do Mediterrâneo (CASTROVIEJO, 2009).

Tradicionalmente este género era classificado na família Scrophulariaceae, todavia, estudos recentes de filogenia molecular (OLMSTEAD, 2001) colocam-no na família Plantaginaceae (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação sistemática do género *Digitalis* L.

Taxonomia	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Plantaginaceae
Género	<i>Digitalis</i> L.

Todas as espécies de *Digitalis* são plantas herbáceas anuais ou bianuais, com folhas simples, alternadas ao longo do caule, formando rosetas de folhas na parte basal. As flores são zigomórficas, dispostas em racemos bracteados terminais. O cálice é pentalobado e mais curto que a corola. A corola tubulosa é constricta na base e o limbo encontra-se dividido em dois lábios, sendo o lábio superior geralmente mais curto que o inferior, que se apresenta variegado na região interior (BRAÜCHLER, 2004).

Atualmente, em Portugal, são reconhecidas apenas duas espécies – *Digitalis purpurea* L. e *Digitalis thapsi* L. No entanto, através de uma análise pormenorizada das Floras Nacionais (Tabela 2), é possível constatar que nem sempre foi assim.

Segundo Gonçalo Sampaio, em Flora Portuguesa (1919), o género *Digitalis* compreende três espécies, *Digitalis purpurea* L., *Digitalis thapsi* L. e *Digitalis amandiana* Samp. É feita ainda a subdivisão da *Digitalis purpurea* em quatro variantes: *tomentosa* Brot., *nevadensis* Kze., *longibracteata* Henr. e *meniana* Cout. É importante mencionar que Sampaio refere a existência de um híbrido entre *D. purpurea* e *D. thapsi*, distinguindo-o de *D. thapsi* pela presença de: “Folhas não glandulo-viscosas e amareladas, mas sim tomentoso-acinzentadas por baixo, pouco ou nada decorrentes”.

Por sua vez, António Pereira Coutinho, em Flora de Portugal (1939), divide o género *Digitalis* em três espécies: *Digitalis purpurea* L., *Digitalis minor* L. e

Digitalis thapsi L., fazendo ainda a sub-divisão de *Digitalis purpurea* L. em *genuina*, *longibracteata* Henriq, *tomentosa* Brot, *miniana* Samp e *nevadensis* Kze, e de *Digitalis thapsi* L. em *amandiana* Samp.

Por fim, João do Amaral Franco, em Nova Flora de Portugal (1984), distingue apenas *Digitalis thapsi* L. da *Digitalis purpurea* L. subdividindo esta última nas sub-espécies *purpurea*, *mariana* e *heywoodii*. É posta de parte *Digitalis amandiana* como sub-espécie da *Digitalis thapsi*, como refere Coutinho.

Tabela 2 - Divisão do género *Digitalis* L. segundo as Floras Nacionais.

G.Sampaio (1919)	A.P.Coutinho (1939)	J.A.Franco (1984)
<i>D. purpurea</i>	<i>D. purpurea</i>	<i>D. purpurea</i>
- <i>tomentosa</i>	- <i>genuína</i>	- <i>purpurea</i>
- <i>nevadensis</i>	- <i>longibracteata</i>	- <i>mariana</i>
- <i>longibracteata</i>	- <i>tomentosa</i>	- <i>heywoodii</i>
- <i>miniana</i>	- <i>miniana</i>	<i>D. thapsi</i>
<i>D. thapsi</i>	- <i>nevadensis</i>	
<i>D. amandiana</i>	<i>D. minor</i>	
<i>D. purpurea</i> X <i>D. thapsi</i>	<i>D. thapsi</i>	
	- <i>amandiana</i>	

***Digitalis pupurea* L.**

Digitalis purpurea L. (Fig. 2) é a planta mundialmente conhecida como “digitalis”. O nome em alemão para as flores de dedaleira era “Fingerhut” (dedal) e então a palavra em latim que significava dedo, *digitalis*, foi adaptada como nome para o seu género (RAMOS, 2010). Em português esta planta é vulgarmente conhecida como “dedaleira” (COSTA, 2002).



Figura 2 - *Digitalis purpurea* L. ^[4]

A nível geográfico cresce de forma espontânea na Europa Central e Meridional, sendo vulgar em Portugal (Fig. 5A) em terrenos não calcários, de preferência siliciosos, húmidos, frescos e sombrios (COSTA, 2002; CUNHA, 2005).

Trata-se de uma planta herbácea bienal, que no primeiro ano de vida se encontra confinada a uma roseta de folhas de onde brota, no segundo ano, um caule aéreo simples, que pode atingir 1 a 1,5 metros de altura. Após a libertação das sementes, a planta seca e termina o seu ciclo de vida. O caule é constituído por folhas alternas, oval-lanceoladas e pubescentes, e termina num cacho unilateral de flores pendentes. As flores apresentam corola tubulosa-campanulada, bilabiada, de cor púrpura, com pontuações no interior e pubescente, e a inserção das mesmas ocorre diretamente na haste (COSTA, 2002).

É considerada uma espécie politípica complexa, divisível pelo menos em três subespécies, com variantes locais. A subespécie *purpurea* apresenta grande polimorfismo e variação quanto à altura, ao indumento, dimensões e forma das folhas e das brácteas, pedicelos, cálices, cor e variegado da corola. Algumas populações locais exibem combinações características destes caracteres variáveis, mas o esquema de variação é muito complexo e flutuante de modo a poder considera-las como subespécies. Para além desta variação local verifica-se uma diferenciação regional entre as populações da Península Ibérica e as da restante Europa. A esta variação morfológica, acrescenta-se ainda a ocorrência de fenómenos frequentes de introgressão com *D. thapsi* (FRANCO, 1984; CASTROVIEJO, 2009).

Trata-se de uma espécie com grande importância farmacológica, que constitui um recurso de glicosídeos cardiotónicos chamados cardenólidos, utilizados para a insuficiência cardíaca (BRAÜCHLER, 2004). Entre os cardenólidos mais utilizados encontram-se a digoxina e a digitoxina (Fig. 3), (FOGLIO *et al.*, 2006).

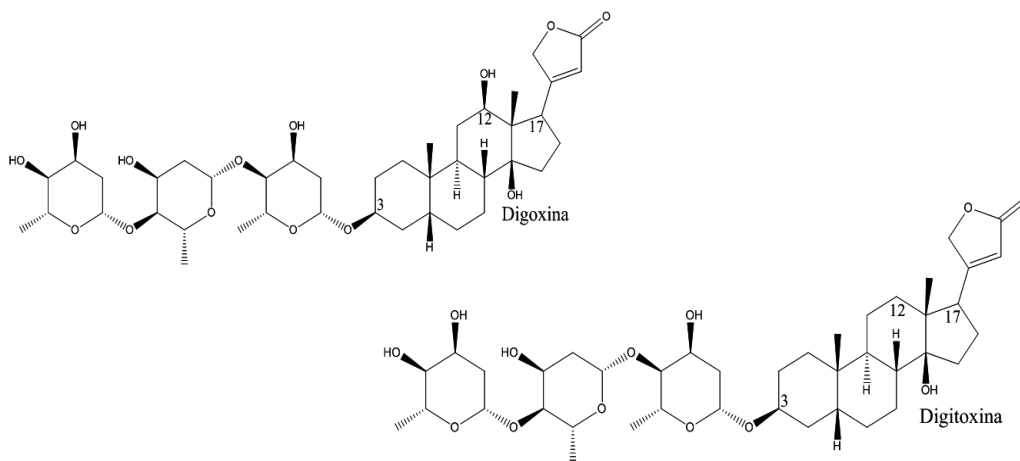


Figura 3 - Estrutura química da Digoxina e da Digitoxina. ^[3]

***Digitalis thapsi* L.**

Digitalis thapsi L. (Fig. 4) é uma espécie endêmica da Península Ibérica, que cresce espontaneamente nas zonas montanhosas da região central e ocidental (CUNHA, 2005).

Em Portugal, encontra-se em terrenos siliciosos, graníticos e arenosos, de Trás-os-Montes, Minho, Beira e Alto Alentejo (Fig.5B), sendo conhecida entre o povo pelos nomes de bonecreira (região do Douro), abeloura, erva-dedal ou dedaleira (Da GRAÇA, 1967; CUNHA, 2005).



Figura 4 - *Digitalis thapsi* L. ^[5]

Atualmente, esta espécie encontra-se sem estatuto de proteção. Contudo, a conservação deste endemismo é extremamente importante, uma vez que apresenta uma área geográfica de distribuição muito restrita (Fig. 5B), tanto a nível da Península Ibérica como em Portugal (PROJECTO LIFE, 2008).

Trata-se de uma planta herbácea, vivaz, com caules eretos, folhosos, mais ou menos encurvados, que podem atingir 50-70 cm de altura. Desenvolve caules rastejantes, do tipo estolhos, a partir dos quais há crescimento de novas plantas. As folhas são lanceoladas e as flores são pêndulas, dispostas

unilateralmente. A corola tubuloso-campanulada apresenta coloração rósea, sendo esbranquiçada à volta das máculas. As flores são suportadas por um pedicelo longo, que excede o comprimento do cálice (Da GRAÇA, 1967).

A nível químico, *D. thapsi* possui uma grande variedade de compostos químicos, que incluem um elevado número de heterósidos digitálicos, entre os quais a digitoxina e ainda geninas flavónicas, tais como apigenina (ANGULO-CARPIO & De RIVERA, 1964; Da GRAÇA, 1967). De salientar que alguns ensaios demonstram que as suas folhas possuem atividade biológica superior a *D. purpurea*, como refere Da Graça (1967).

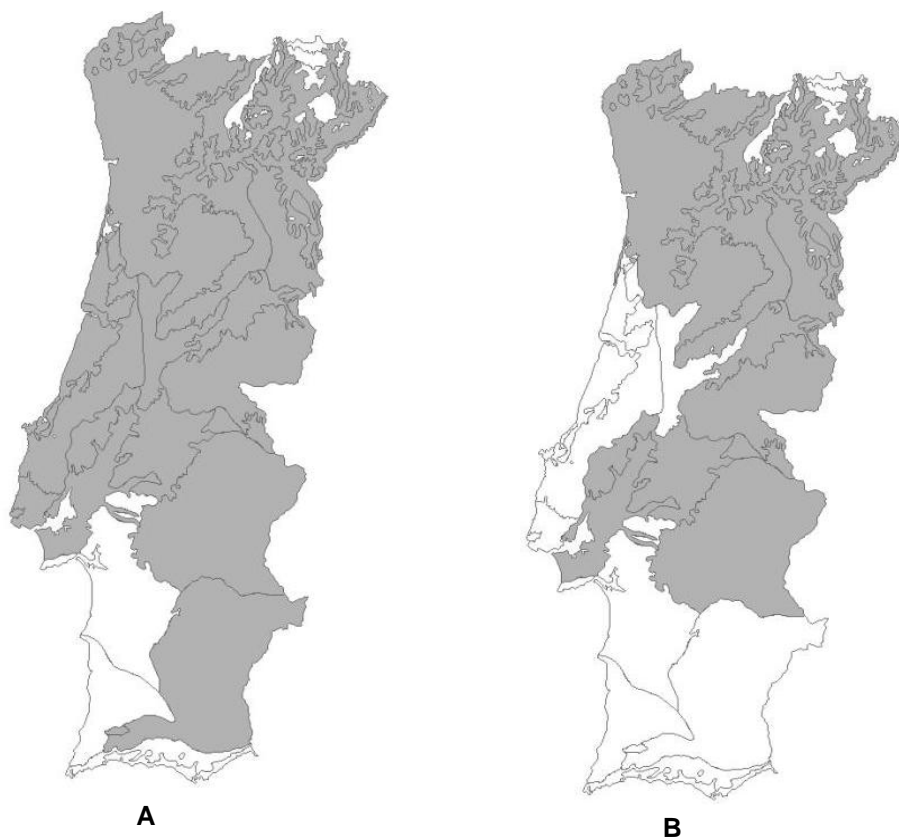


Figura 5 - Distribuição geográfica de *Digitalis purpurea* L. (A) e *Digitalis thapsi* L. (B) em Portugal continental. ^[6,7]

3. A Hibridação nas plantas

Entende-se por hibridação (no reino vegetal) o cruzamento interespecífico que origina plantas viáveis ou isoladas dos taxa dos progenitores. Trata-se de uma característica relativamente comum nas plantas vasculares, mas a sua frequência varia consideravelmente entre famílias e géneros (HEGARTY & HISCOCK, 2005).

Atualmente é considerado como um fenómeno que desempenha um papel importante na evolução das angiospérmicas e na diversificação em muitos grupos taxonómicos, pois promove o aumento da diversidade genética, origina adaptações, ecótipos ou espécies novas, e quebra ou reforça o isolamento (ZHU *et al.*, 2009; RIESEBERG & ELLSTRAND, 1993). Pode ainda ser vital para a persistência de espécies raras que ocorrem em simpatria com parentes interférteis, desde que haja barreiras que permitam a sua ocorrência e a fluência de genes interespecíficos (MA *et al.*, 2010). No entanto, de acordo com alguns autores (LEVIN *et al.*, 1996; RHYMER & SIMBERLOFF, 1996), a hibridação pode representar uma ameaça em espécies raras compatíveis, ao substituir um gene importante por um mais comum. A nível ecológico pode ocorrer uma influência do híbrido sobre os organismos com os quais interage, competindo com outras espécies (CATTELL & KARL, 2004).

A significância evolutiva da hibridação depende da aptidão e adequação do híbrido em relação às espécies parentais. Se entre as espécies parentais podem ocorrer fenómenos de introgressão, a aptidão do híbrido tem de ser suficiente para a sua sobrevivência e retrocruzamento com as espécies que lhe deram origem. Se a aptidão do híbrido for inferior em relação aos progenitores, podem formar-se zonas de tensão, o que tem consequências negativas para a produção de plantas híbridas, pois há o reforço de uma incompatibilidade reprodutiva. No caso de a aptidão ser igual ou superior relativamente aos progenitores ao longo da zona de hibridação, as espécies parentais tendem a fundir-se (CATTELL & KARL, 2004).

Em muitos casos, a hibridação pode ser um evento altamente transitório, sem qualquer consequência evolutiva. No entanto, cruzamentos repetidos entre as espécies parentais ou estabilização do sistema reprodutor dos híbridos, pode

resultar na formação de híbridos, de zonas híbridas ou novas espécies híbridas (RIESEBERG, 1997).

A hibridação interespecífica em plantas tem sido foco de inúmeros estudos nas últimas décadas e vários métodos têm sido utilizados para investigar e identificar plantas híbridas (SMITH *et al.*, 1996). O seu estudo desde sempre se baseou em observações morfológicas, nomeadamente de características intermédias, e em cruzamentos artificiais, bem como o estudo da meiose. No entanto, estes métodos eram um pouco limitados em plantas, uma vez que híbridos de espécies fortemente relacionadas não revelam necessariamente diferenças morfológicas e a análise da meiose fornece apenas uma pequena visão da interação entre espécies (HEGARTY & HISCOCK, 2005).

Atualmente estão disponíveis várias técnicas moleculares que possibilitam a análise de híbridos de forma mais detalhada, nomeadamente técnicas micromoleculares, variação cromossómica, isoenzimas, e análise direta de ADN, a mais recente. Esta última provou ser a mais conclusiva e satisfatória na deteção de indivíduos híbridos (SMITH *et al.*, 1996).

4. A Hibridação no género *Digitalis* L.

Os híbridos entre as várias espécies de *Digitalis* foram estudados ao longo do tempo e produzidos com relativa facilidade para obtenção e análise de compostos com interesse farmacológico. Na literatura, os híbridos estudados com maior frequência através de cruzamentos artificiais, são os que ocorrem entre *Digitalis purpurea* L. e *Digitalis lutea* L. e entre *Digitalis purpurea* L. e *Digitalis grandiflora* Mill. (JONES, 1912).

Angulo-Carpio & De Rivera (1962) realizaram um estudo para obtenção de híbridos interespecíficos entre *D. purpurea* e *D. thapsi*, com vista à aquisição de novos híbridos com interesse medicinal. Foram efetuados cruzamentos recíprocos controlados entre *D. purpurea* x *D. thapsi* e *D. thapsi* x *D. purpurea*, com elevada fertilidade e obtenção de numerosos frutos e sementes. A maioria dos frutos apresentou caracteres morfológicos intermédios relativamente aos progenitores, manifestando sempre uma predominância dos correspondentes à planta mãe. As plantas cultivadas, correspondentes à primeira, segunda e

terceira geração, revelaram uma grande fertilidade e desenvolvimento foliar. Simultaneamente, uma análise ao conteúdo foliar, revelou uma maior riqueza em princípios ativos.

Em meio natural, o número de ocorrências de hibridação é limitado, o que se deve à distribuição geográfica de cada espécie (KOLE, 2011). No entanto, as espécies deste género apresentam características que possibilitam e favorecem a ocorrência deste fenómeno.

Sob o ponto de vista genético e citológico todas as espécies de *Digitalis*, salvo algumas exceções, apresentam número diplóide $2n=56$, incluindo *D. purpurea* e *D. thapsi* (BUXTON & NEWTON, 1928; REGNART, 1935; ANGULO-CARPIO, 1957). Simultaneamente, são espécies que apresentam uma grande regularidade meiótica e uma analogia entre o número e estrutura dos cromossomas. Por outro lado, a própria morfologia da flor permite uma fácil polinização e a preservação de novas variedades obtidas por alogamia, o que favorece o aparecimento de indivíduos geneticamente diferentes. Estas características, manifestadas tanto por *D. purpurea* como *D. thapsi*, constituem condições propícias para conseguir cruzamentos férteis e simultaneamente, favorecem a obtenção de hibridações interespecíficas (ANGULO-CARPIO & De RIVERA, 1964).

A facilidade de hibridação que se verifica no género *Digitalis* motiva o aparecimento de novas raças e variedades de forma natural no meio ambiente. De acordo com a Flora Ibérica (CASTROVIEJO, 2009), a subespécie *D. purpurea purpurea* e *D. thapsi* apresentam um elevado grau de infertilidade, originando populações introgressivas nas áreas onde coexistem, Sistema Central. Os indivíduos resultantes caracterizam-se por apresentarem caules e folhas com indumento misto, formado por tricomas glandulíferos e tectores, corolas mais ou menos purpúreas e folhas não decorrentes. Esta variedade existe a norte de Portugal e foi identificada por botânicos portugueses como *D. minor*.

5. Material e métodos

5.1 Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram utilizados exemplares do género *Digitalis*: *Digitalis purpurea* L., *Digitalis thapsi* L. e o suposto híbrido, provenientes do trabalho experimental realizado no Laboratório de Farmacognosia da FFUL (FRAZÃO *et al.*, 2008), relativamente ao estudo morfológico de cerca de trinta exemplares de cada espécie. Os exemplares foram colhidos no ano 2007 pela equipa de investigação do Laboratório supracitado, a noroeste de Portugal, mais especificamente na Barragem da Marateca, onde ocorre *D. thapsi*, e em Seia, onde *D. purpurea* e *D. thapsi* coexistem. Este material foi seco e conservado para realização de trabalhos futuros.

Os exemplares “voucher” encontram-se depositados no herbário João de Carvalho e Vasconcelos, no Instituto Superior de Agronomia de Lisboa.

5.2 Métodos

O estudo morfológico macroscópico incidiu sobre a folha, o cálice e a corola dos três exemplares, recorrendo a observação direta e à lupa binocular. Por sua vez, o estudo morfológico microscópico incidiu sobre a folha, com recurso a técnicas histológicas, microscopia ótica e eletrónica de varrimento.

5.2.1 Análise macroscópica

Os exemplares em estudo foram observados a olho nu e recorrendo a uma lupa binocular modelo Olympus SZ61, à qual se acoplou uma fonte de luz modelo Olympus KL1500LCD. A análise macroscópica atendeu à forma, recorte, coloração, pubescência e nervação do limbo, à forma e disposição do cálice, bem como à morfologia e coloração da corola.

5.2.2 Análise microscópica

5.2.2.1 Microscópio ótico (MO)

A análise microscópica incidiu ao nível da zona média do limbo foliar de 10 amostras dos exemplares de cada espécie e do híbrido.

Cada porção da zona média a analisar foi sujeita a clarificação em hidrato de cloral, durante 10 minutos. Recorrendo a técnicas histológicas, foram efetuados manualmente, destacamentos de epiderme de ambas as páginas, bem como cortes transversais.

As amostras foram posteriormente observadas e analisadas ao microscópio ótico modelo Olympus CX40, com as ampliações de 4x, 10x, 20x e 40x.

O registo fotográfico foi efetuado com uma câmara com sistema fotográfico Olympus ColorView Illu e as imagens processadas com o Software Cell D (Olympus Soft Imaging Solutions).

Na análise microscópica incidiu-se na observação das características do tecido epidérmico em ambas as páginas foliares, atendendo à forma, dimensão e orientação das células epidérmicas. Procedeu-se à observação das características dos estomas, como medidas, tipo e cálculo do índice estomático. Procedeu-se ainda à observação das características dos tricomas, como medidas e tipo.

Os estomas foram classificados de acordo com a Farmacopeia Portuguesa IX e o índice estomático foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:
$$\left[\frac{\text{número de estomas (S)}}{\text{número de estomas (S)} + \text{Número de células epidérmicas (E)}} \right] \times 100.$$

5.2.2.2 Microscópio eletrónico de varrimento (SEM)

Para a análise ao microscópio eletrónico de varrimento, as amostras secas foram preparadas recorrendo à montagem das páginas superior e inferior das folhas em suporte metálico apropriado, de modo a serem sujeitas a um processo de metalização com ouro (metalizador JEOL JSM-1200 Fine Coater).

As observações foram efetuadas com recurso a um microscópio eletrónico de varrimento, modelo JEOL JSM-5200LV, a 15 KV, com um sistema de aquisição direta de imagem.

A análise ao microscópio eletrónico incidiu ao nível da superfície epidérmica, na distribuição e tipo de estomas e tricomas.

5.2.3 Análise de dados

Os resultados da análise macroscópica foram obtidos através de uma comparação e compilação dos nossos dados com os já obtidos em trabalhos experimentais anteriores no Laboratório de Farmacognosia da FFUL.

Os dados referentes à análise microscópica para os parâmetros: cutícula, epiderme, dimensão do mesófilo, estomas, índice estomático e tricomas foram tratados estatisticamente para comparar diferenças morfológicas entre espécies através da análise de variância a um fator, ANOVA, com nível de significância de 5%, recorrendo ao programa estatístico SPSS.

6. Resultados

Para os *taxa* em estudo, *D.purpurea* (DP), *D.thapsi* (DT) e híbrido (H) procedeu-se à observação a olho nu e à lupa de caracteres morfológicos e anatómicos macroscópicos, ao nível da folha, do cálice e da corola, que são discriminados em seguida para cada espécie e para o híbrido. A Tabela 3 apresenta as características macroscópicas observadas para cada um dos exemplares.

Os caracteres microscópicos incidiram ao nível da cutícula, epiderme, mesófilo, nervura principal, estomas e tricomas. A Tabela 4 apresenta os parâmetros da anatomia foliar médios observados para os *taxa* em estudo. A Tabela 5 sintetiza o tipo de tricomas encontrados em cada *taxa* e a Tabela 6 apresenta as dimensões médias dos tricomas.

6.1 *Digitalis purpurea*

Análise macroscópica

D. purpurea apresenta folhas alternas, ovadas, de margem crenada e pubescentes, suaves ao tacto, com dimensões aproximadas de 13-15 cm x 4-6 cm. O limbo é ondulado e decorrente, de coloração verde intenso na face superior e verde acinzentado na inferior (Fig. 6A e 6B). Na região da nervura principal a folha apresenta-se côncava na página superior (Fig. 6C) e convexa na inferior. A nervura principal é muito desenvolvida e proeminente na página inferior, e apresenta numerosos tricomas (Fig. 6D). O cálice é pubescente, de coloração verde com rebordo avermelhado, e apresenta um conjunto de 5-6 sépalas largas, concrescente na base e imbricadas, em que uma delas é menor, em termos de comprimento, e mais estreita (Fig. 7A). Os botões florais no início do desenvolvimento apresentam coloração púrpura. Possui flores grandes e pendentes, dispostas em cachos unilaterais num único caule ereto. A inserção das flores ocorre diretamente na haste floral (Fig. 7C). A corola é tubuloso-campanulada, pubescente externa e internamente, e labiada por dois lábios, sendo o superior menor que o inferior, que é alongado e de extremidade pontiaguda ou arredondada (Fig. 7B). Exibe uma tonalidade púrpura, com máculas internas sob a forma de pontuações, de tonalidade vermelho escuro a púrpura intenso, com dominância de pontuações de grande dimensão. Cada mácula encontra-se rodeada por uma mancha branca-amarelada (Fig. 7D).

Análise microscópica

A folha apresenta cutícula lisa em ambas as páginas (Fig. 8A e 8B), com espessura de 3,28 µm na superior e de 2,79 µm na inferior (Fig. 21). As células da epiderme superior são de forma poligonal (Fig. 8C), com razão comprimento / largura de 1,62. Os estomas são do tipo anomocítico, em número reduzido, de comprimento e largura médios de 20µm e 15,68 µm, (Fig. 22). A epiderme inferior apresenta células de forma irregular (Fig. 8D e 10A), com razão comprimento / largura de 1,89. Os estomas são em grande abundância, também do tipo anomocítico (Fig. 8D e 10B), de comprimento e largura médios de 23,88 µm e 15,33 µm, (Fig. 22). O índice estomático (Fig. 23) e a relação

numérica de estomas considerados para esta espécie foram os obtidos por Martinez (1946), (Tabela 4).

No mesófilo verifica-se a presença de uma camada de células clorofilinas, dispostas em paliçada, com espessura de 41,95 μm (Fig. 8E1). Segue-se um tecido lacunoso e clorofilino, com 67,75 μm de espessura, constituído por três a quatro camadas de células alongadas, que se prolongam até à epiderme inferior (Fig. 8E2). O valor da espessura total do mesófilo é de 109,69 μm (Fig. 24).

Na página inferior, a nervura principal apresenta numerosos tricomas, maioritariamente do tipo tector, que se encontram todos emaranhados, formando uma densa rede (Fig. 8F).

Ao longo da folha e das nervuras é possível encontrar tricomas secretores (Fig. 25), de pedicelo pluricelular com duas (Fig. 9A), três (Fig. 9B) ou quatro células (Fig. 9C), unisseriados e de cabeça unicelular, com comprimentos pedicelares médios de 41,2 μm , 145,77 μm , 416, 17 μm , e cabeça com razão comprimento / largura de 0,86, 0,82, 0,86, respetivamente. Também são visíveis tricomas com pedicelo unicelular e cabeça unicelular (Fig. 9D) ou bicelular (Fig. 9E) de comprimentos pedicelares médios de 20,46 μm e 41,91 μm e cabeça com razão comprimento / largura de 1,47 e 0,97, respetivamente. Verificou-se a presença de um tricoma secretor de cabeça bicelular quase sempre localizado na zona correspondente à nervura, mas na página superior (Fig. 8F), (Tabelas 5 e 6). Também se encontram tricomas tectores (Fig. 25), pluricelulares, unisseriados e eretos, com comprimento médio de 518,32 μm , constituídos por duas a cinco células compridas, sendo mais comum os de três a cinco células (Fig. 9F). Verificam-se ainda tricomas tectores de paredes delgadas e pontuadas, com célula terminal alongada e de extremidade arredondada. Alguns destes tricomas apresentam-se lisos, e outros colapsados e curvos (Fig. 10A), (Tabelas 5 e 6).

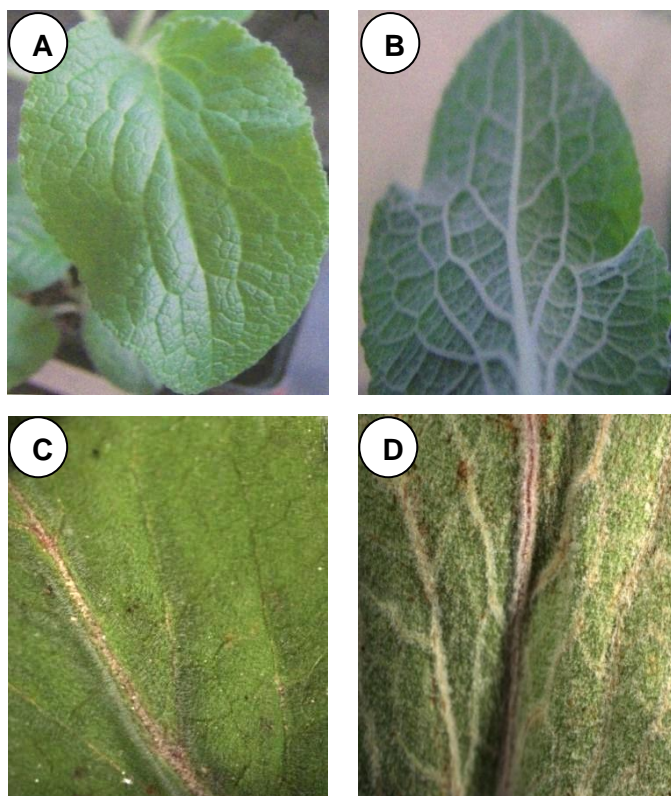


Figura 6 - *D. purpurea* L., aspetos gerais da folha: **A** – Página superior; **B** – Página inferior evidenciando nervuras; **C** – Pormenor da página superior evidenciando tricomas; **D** – Pormenor da página inferior evidenciando tricomas (fotos gentilmente cedidas pela Dr.^a Sofia Frazão).

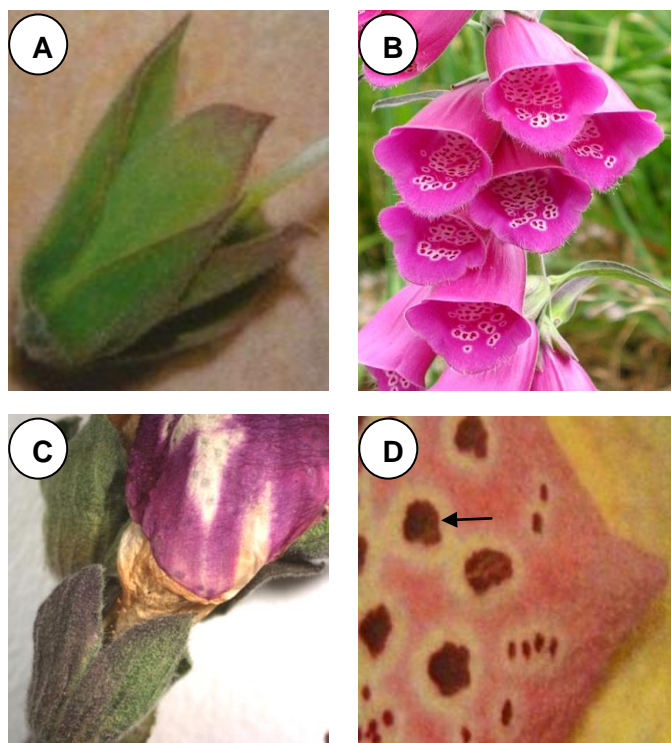


Figura 7 - *D. purpurea* L., aspetos gerais da flor: **A** – Cálise; **B** – Corola ^[4]; **C** – Corola com pormenor de inserção no cálise; **D** - Pormenor das máculas (seta) (fotos gentilmente cedidas pela Dr.^a Sofia Frazão).

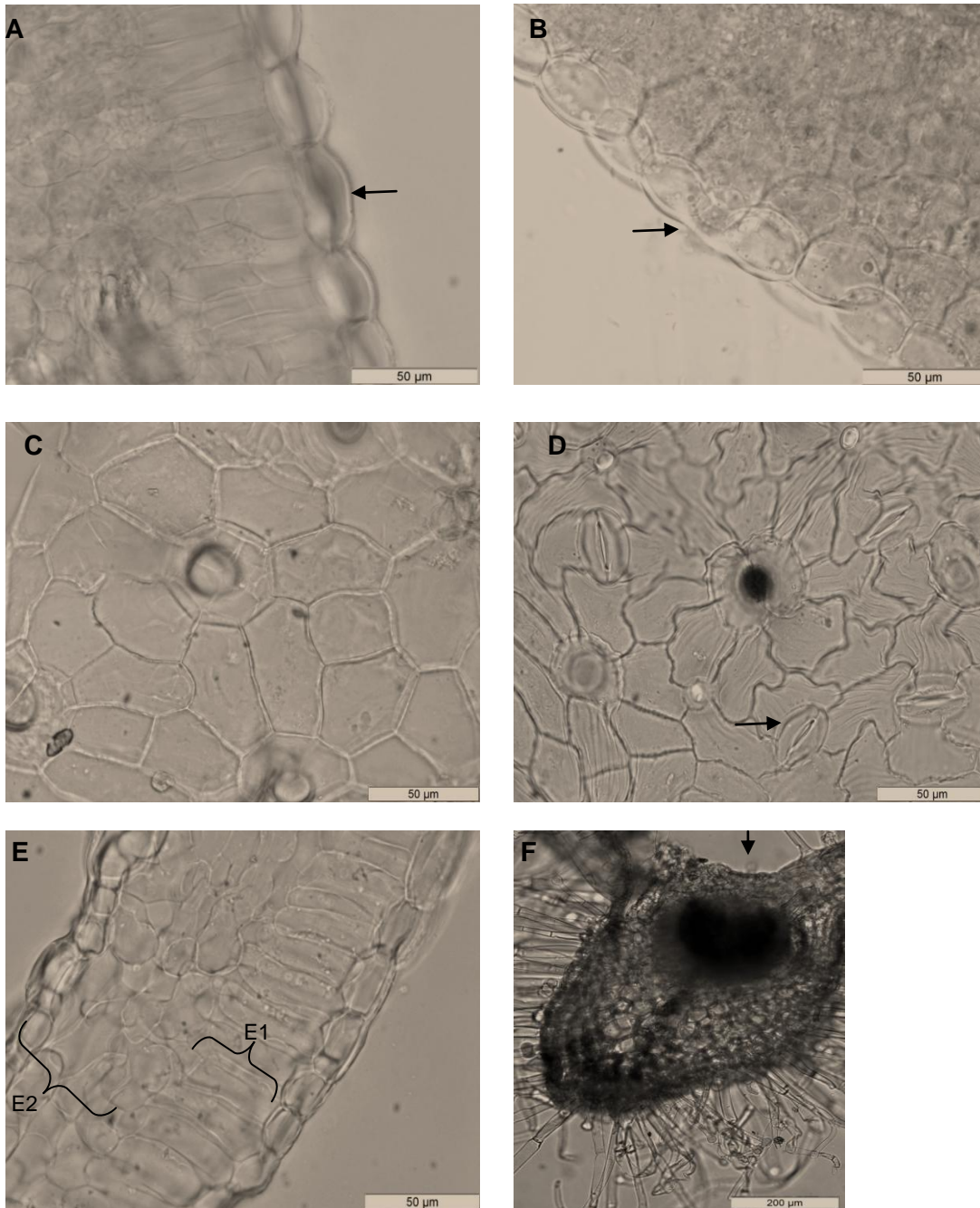


Figura 8 - *D. purpurea* L. (MO): **A** – Cutícula (seta) da página superior da folha em corte transversal (barra de escala: 50 µm); **B** – Cutícula (seta) da página inferior da folha em corte transversal (barra de escala: 50 µm); **C** – Epiderme da página superior da folha (barra de escala: 50 µm); **D** – Epiderme da página inferior da folha evidenciando estoma (seta) (barra de escala: 50 µm); **E** – Corte transversal da folha com parênquima clorofilino em paliçada (seta preta) e parênquima lacunoso (seta azul) (barra de escala: 50 µm); **F** – Corte transversal da nervura principal evidenciando tricoma de cabeça bicelular na epiderme superior (seta) (barra de escala: 200 µm).

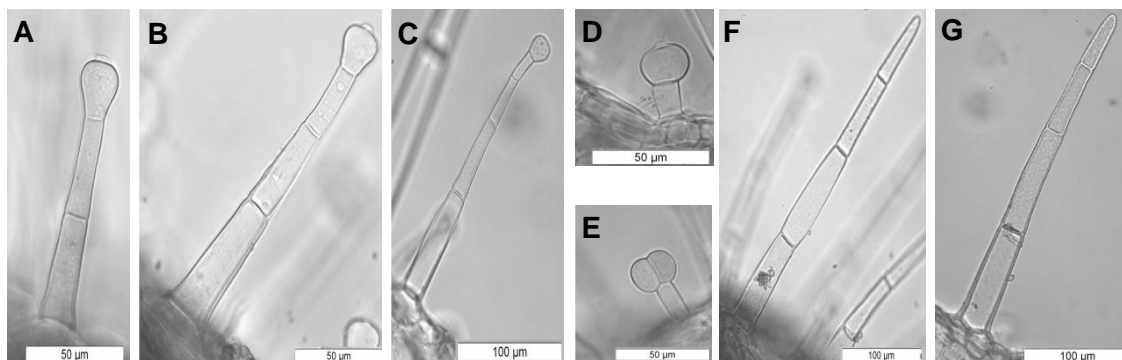


Figura 9 - *D. purpurea* L. (MO): Tricomas secretores de pé pluricelular e cabeça unicelular, com pé de 2 células (**A**) (barra de escala: 50 µm), de 3 células (**B**) (barra de escala: 50 µm), de 4 células (**C**) (barra de escala: 100 µm); Tricomas secretores de pé unicelular e cabeça unicelular (**D**) (barra de escala: 50 µm) e bicelular (**E**) (barra de escala: 50 µm) e Tricoma tector (**F**, **G**) (barra de escala: 100 µm).

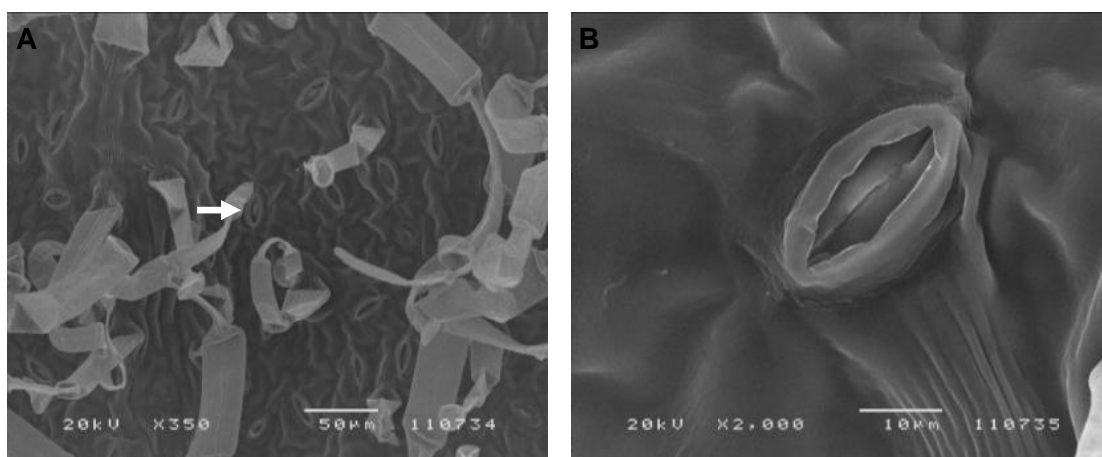


Figura 10 - *D. purpurea* L. (MEV): **A** – Pormenor da superfície da epiderme inferior evidenciando tricomas secretores colapsados (seta) (barra de escala: 50 µm); **B** – Pormenor de estoma anomocítico (barra de escala: 10 µm).

6.2 *Digitalis thapsi*

Análise macroscópica

Em *D. thapsi* as folhas são lanceoladas, de margem serrada, muito pubescentes, de indumento amarelo e glutinosas ao tato, com 10-15 cm x 4-6 cm. O limbo é ondulado e decorrente, de coloração verde-amarelado em ambas as páginas (Fig. 11A e 11B). Na região da nervura principal a folha apresenta-se côncava na página superior (Fig. 11C) e convexa na inferior. A nervura principal é muito desenvolvida e proeminente na página inferior, e apresenta numerosos tricomas (Fig. 11D). O cálice é pubescente de coloração verde amarelado e possui um conjunto de 5 sépalas de igual tamanho, estreitas e concrescentes na base (Fig. 12A). No desenvolvimento inicial os botões florais apresentam-se variegados de coloração rosa escuro e amarelo. Possui flores grandes e pendentes, dispostas em cachos unilaterais num único caule ereto. As flores são suportadas por um pedicelo longo, que excede o comprimento do cálice. A corola é tubuloso-campanulada, pubescente externa e internamente, e labiada por dois lábios, sendo o superior menor que o inferior, que é alongado e de extremidade pontiaguda ou arredondada (Fig. 12B). Manifesta uma reentrância curvilínea próxima do cálice, que lhe confere um aspecto em S (Fig. 12C). Apresenta uma coloração rosácea com máculas internas sob a forma de pontuações de coloração rosa de pequena dimensão, que se encontram rodeadas por uma mancha branca amarelada (Fig. 12D).

Análise microscópica

Apresenta cutícula reticulada e espessa em ambas as páginas (Fig. 13A e 13B), com 7,15 µm de espessura na página superior e 8,74 µm na inferior (Fig. 21). Na epiderme superior as células são de forma poligonal (Fig. 13C), com razão comprimento / largura de 1,40. Os estomas (Fig. 22) são do tipo anomocítico (Fig. 13C), de comprimento e largura médios de 20,20 µm e 15,69 µm. A epiderme inferior apresenta células de forma irregular (Fig. 13D e 15A) com razão comprimento / largura de 1,35, e grande abundância de estomas, também do tipo anomocítico (Fig. 13D, 15B e 22), com 20,98 µm de comprimento e 15,11 µm de largura. O índice estomático (Fig. 23) calculado foi

de 3,81 para a página superior e 7,65 para a inferior. A relação numérica de estomas foi de 1:2,5 (Tabela 4).

O mesófilo é constituído por duas a três camadas de células dispostas em paliçada (Fig. 13E1), sendo mais comum três, com espessura de 106,02 μm , e quatro a cinco camadas de células arredondadas e alongadas no parênquima lacunoso (Fig. 13E2), com 110,73 μm de espessura. O valor obtido para a espessura total do mesófilo é de 282,60 μm (Fig. 24).

Na página inferior, a nervura principal apresenta numerosos tricomas (Fig. 13F e 25), todos do tipo secretor, que se encontram eretos, livres e na sua maioria apresentam célula terminal contendo uma secreção de coloração amarelo dourado no interior (Fig. 14E).

Ao longo da folha e das nervuras encontram-se tricomas secretores de cabeça unicelular e pedicelo pluricelular com duas (Fig. 14A), três (Fig. 14B), quatro (Fig. 14C e 14D), cinco (Fig. 14E) ou mais células (Fig. 14F), com comprimentos pedicelares médios de 73,22 μm , 123,68 μm , 539,23 μm e 224,72 μm respetivamente, e glândula de razão comprimento / largura de 1,02, 1,05, 1,60 e 0,78. Existem ainda tricomas com pé unicelular e cabeça unicelular ou bicelular (Fig. 14E e 14F), de comprimentos pedicelares médios de 18,92 μm e 6,86 μm , e glândula razão comprimento / largura de 1,55 e 1,01. Verificou-se a presença de um tricoma secretor de cabeça bicelular localizado na zona correspondente à nervura, mas na página superior (Fig. 13F), (Tabelas 5 e 6).

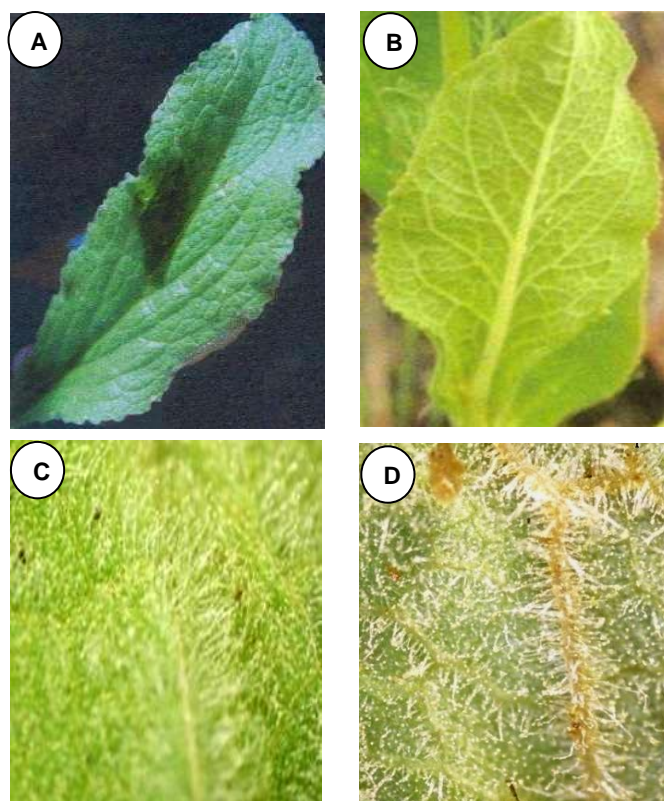


Figura 11 - *D. thapsi* L., aspetos gerais da folha: **A** – Página superior; **B** – Página inferior evidenciando nervuras; **C** – Pormenor da página superior evidenciando tricomas; **D** – Pormenor da página inferior evidenciando tricomas (fotos gentilmente cedidas pela Dr.^a Sofia Frazão).

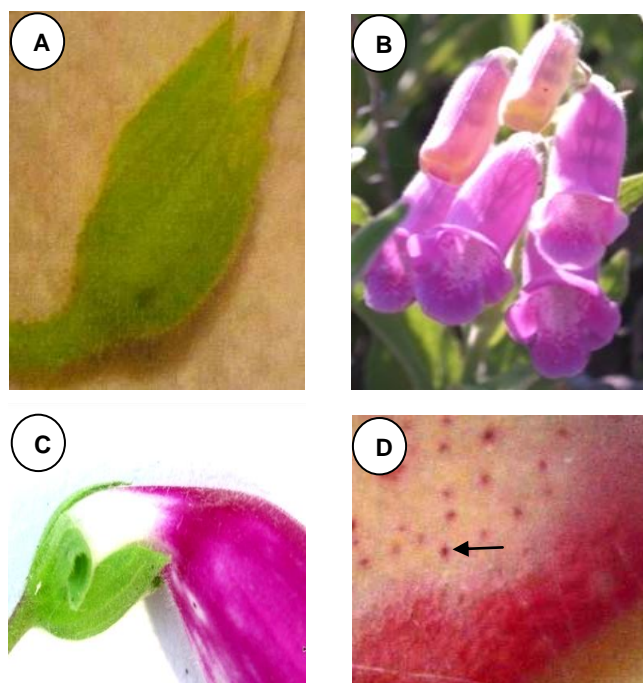


Figura 12 - *D. thapsi* L., aspetos gerais da flor: **A** – Cálice; **B** – Corola; **C** - Corola evidenciando reentrância em S; **D** – Pormenor das máculas (seta) (fotos gentilmente cedida pela Dr.^a Sofia Frazão).

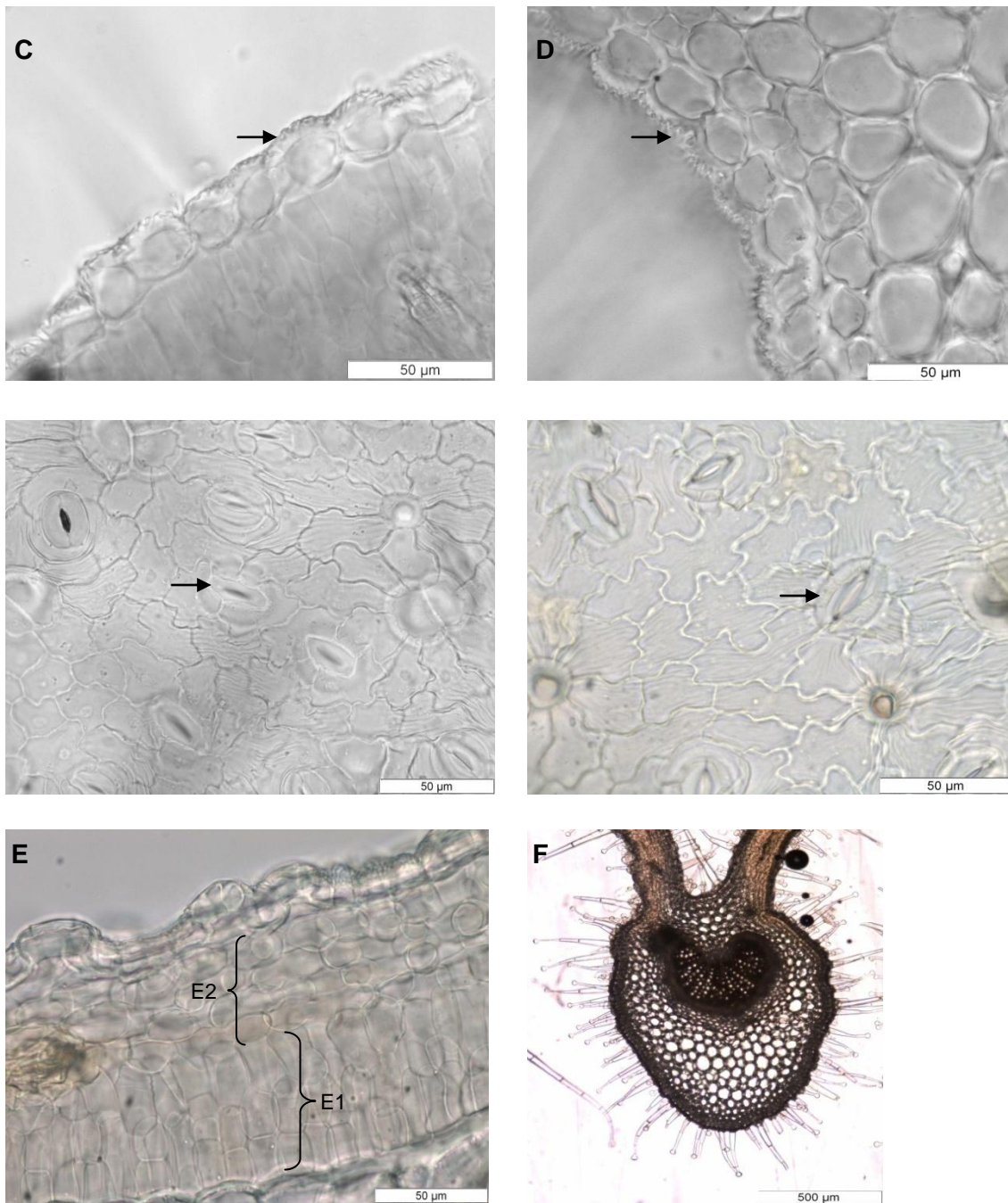


Figura 13 - *D. thapsi* L. (MO): **A** – Cutícula (seta) da página superior da folha em corte transversal (barra de escala: 50 μm); **B** – Cutícula (seta) da página inferior da folha (barra de escala: 50 μm); **C** – Epiderme da página superior da folha em corte transversal (barra de escala: 50 μm); **D** – Epiderme da página inferior da folha evidenciando estoma (seta) (barra de escala: 50 μm); **E** – Corte transversal da folha com parênquima clorofilino em paliçada (E1) e parênquima lacunoso (E2) (barra de escala: 50 μm); **F** – Corte transversal da nervura principal evidenciando tricoma de cabeça bicelular na epiderme superior (seta) (barra de escala: 500 μm).

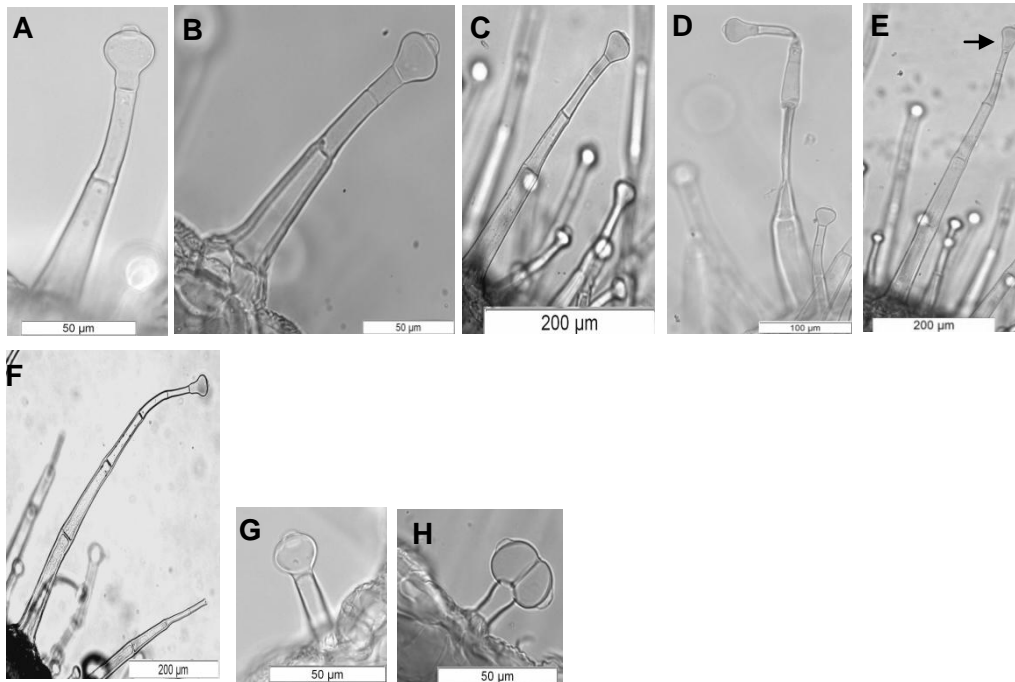


Figura 14 - *D. thapsi* L. (MO): Tricomas secretores de pé pluricelular e cabeça unicelular, com pé de 2 células (**A**) (barra de escala: 50 µm), de 3 células (**B**) (barra de escala: 50 µm), de 4 células (**C** e **D**) (barra de escala: 100 µm), de 5 células e cabeça com secreção amarela (seta) (**E**) (barra de escala: 200 µm) de 6 células (barra de escala: 100 µm) (**F**); Tricomas secretores de pé unicelular e cabeça unicelular (**G**) (barra de escala: 50 µm) e bicelular (**H**) (barra de escala: 50 µm).

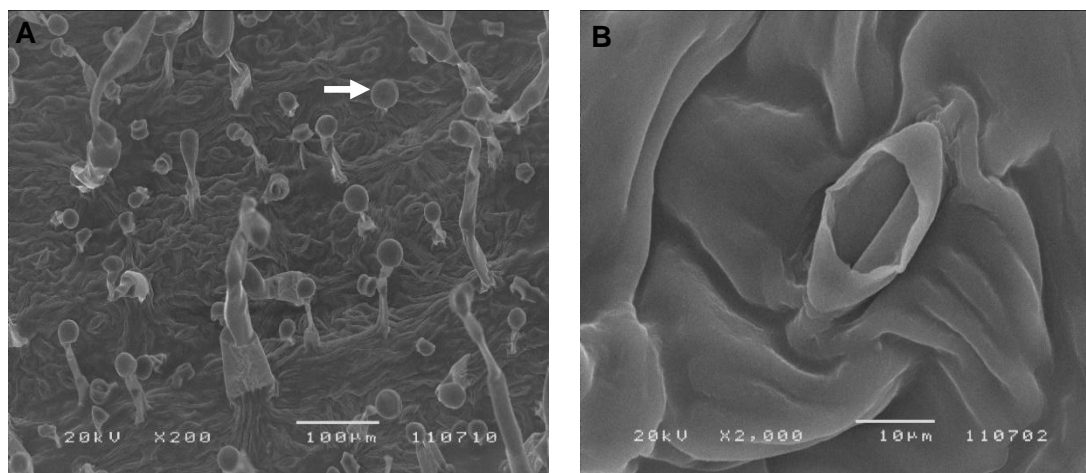


Figura 15 - *D. thapsi* L. (MEV): **A** – Pormenor da superfície da epiderme inferior evidenciando tricomas secretores (seta) (barra de escala: 100 µm); **B** – Pormenor de estoma anomocítico (barra de escala: 10 µm).

6.3 Híbrido

Análise macroscópica

Apresenta folhas alternas, lanceoladas, de margem serrada e pubescentes, nem excessivamente macias nem glutinosas ao tato, com dimensões aproximadas de 13-20 cm x 5-7 cm. O limbo é ondulado e decorrente, de coloração verde-escura na página superior e verde-claro na inferior (Fig. 16A e 16B). Na região da nervura principal a folha apresenta-se côncava na página superior (Fig. 16C) e convexa na inferior. A nervura principal é muito desenvolvida e proeminente na página inferior, e apresenta numerosos tricomas (Fig. 16D). O cálice é pubescente de coloração verde-escuro e rebordo arroxeadado, e apresenta um conjunto de 5-6 sépalas, imbricadas, serradas, estreitas, de comprimento desigual e concrescentes na base (Fig. 17A). Os botões florais no início do desenvolvimento são variegados com cor rosa e amarelo. As flores são suportadas por um pedicelo longo, com comprimento menor que o comprimento do cálice. Possui flores grandes e pendentes, dispostas em cachos unilaterais num único caule ereto. A corola é tubuloso-campanulada, pubescente externa e internamente, e labiada por dois lábios, sendo o superior menor que o inferior, que é alongado e de extremidade pontiaguda ou arredondada (Fig. 17B). Verifica-se a presença de uma pequena reentrância curvilínea próxima do cálice, que lhe confere um aspeto em S (Fig. 17C). Manifesta uma coloração rosa-escuro, com máculas internas sob a forma de pontuações de coloração rosa-escuro, de maior e de menor dimensão, não se verificando dominância. O conjunto das máculas encontra-se rodeado por uma mancha branca (Fig. 17D).

Análise microscópica

O híbrido apresenta cutícula reticulada e espessa em ambas as páginas (Fig. 18A e 18B), com espessura de 7,80 µm na página superior e 8,62 µm na inferior (Fig. 21). As células da epiderme superior são de forma poligonal (Fig. 18C), com razão comprimento / largura de 1,58. Os estomas são do tipo anomocítico (Fig. 18C), de comprimento e largura médios de 20,69 µm e 15,29 µm (Fig. 22). A epiderme inferior apresenta células de forma irregular (Fig. 18D e 20A), com razão comprimento / largura de 1,78, e grande abundância de

estomas, também do tipo anomocítico (Fig. 18D, 20B e 22), com comprimento e largura médios de 19,49 μm e 16,11 μm . O valor obtido para o índice estomático foi de 1,79 para a página superior e 7,50 para a inferior (Fig. 23). A relação numérica de estomas para ambas as páginas foliares é de 1:3, (Tabela 4).

O mesófilo apresenta duas camadas de células dispostas em paliçada (Fig. 18E1), com espessura de 41,24 μm . O parênquima lacunoso, com espessura média de 58,42 μm , é constituído por três a quatro camadas de células arredondadas (Fig. 18E2). O valor obtido para a espessura total do mesófilo é de 105,16 μm (Fig. 24).

Na página inferior da folha, a nervura principal apresenta numerosos tricomas (Fig. 25), maioritariamente do tipo secretor, que se encontram eretos e livres (Fig. 18F).

Ao longo da folha e das nervuras encontram-se tricomas secretores de cabeça unicelular e pedicelo pluricelular constituídos por duas (Fig. 19A e 19B), três (Fig. 19C), quatro (Fig. 19D) ou cinco células (Fig. 19E), de comprimentos pedicelares médios de 59,49 μm , 308,71 μm , 486,15 μm e de glândula de razão comprimento / largura 0,79, 1,05 e 1,32. Também se encontram tricomas com pedicelo unicelular e de cabeça unicelular (Fig. 19F) ou bicelular e (Fig. 19G), com comprimentos pedicelares médios de 19,34 μm e 30,66 μm , e glândula de razão comprimento / largura de 0,79 e 0,74. Verificou-se a presença de um tricoma secretor de cabeça bicelular localizado na zona correspondente à nervura, mas na página superior (Fig. 18F), (Tabelas 5 e 6). Verifica-se ainda a existência de tricomas tectores multicelulares e unisseriados de duas a cinco células (Fig. 19I), sendo alguns encurvados e colapsados (Fig. 19H), de comprimento pedicelar de 254,29 μm . Alguns apresentam-se lisos de paredes delgadas e pontuadas, com célula terminal alongada e de extremidade arredondada (Tabelas 5 e 6).

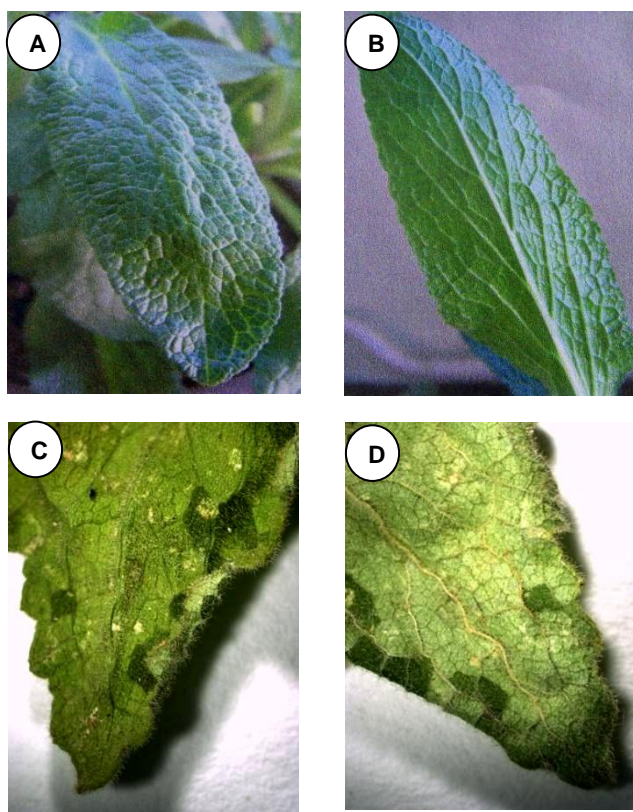


Fig.16 - Híbrido, aspetos gerais da folha: **A** – Página superior; **B** – Página inferior evidenciando nervuras; **C** – Pormenor da página superior evidenciando tricomas; **D** – Pormenor da página inferior evidenciando tricomas (fotos gentilmente cedidas pela Dr.^a Sofia Frazão).

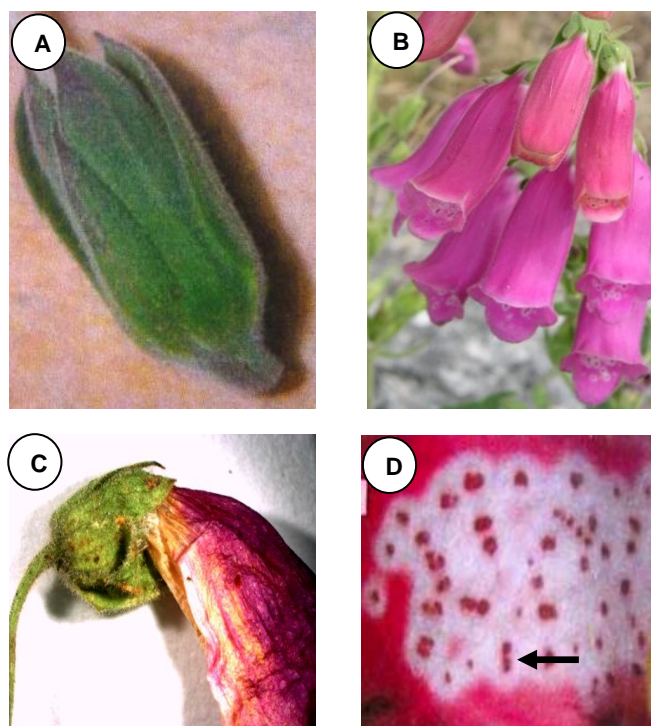


Fig.17 - Híbrido, aspetos gerais da flor: **A** – Cálice; **B** – Corola; **C** – Corola evidenciando reentrância em S; **D** - Pormenor das máculas (seta) (fotos gentilmente cedidas pela Dr.^a Sofia Frazão).

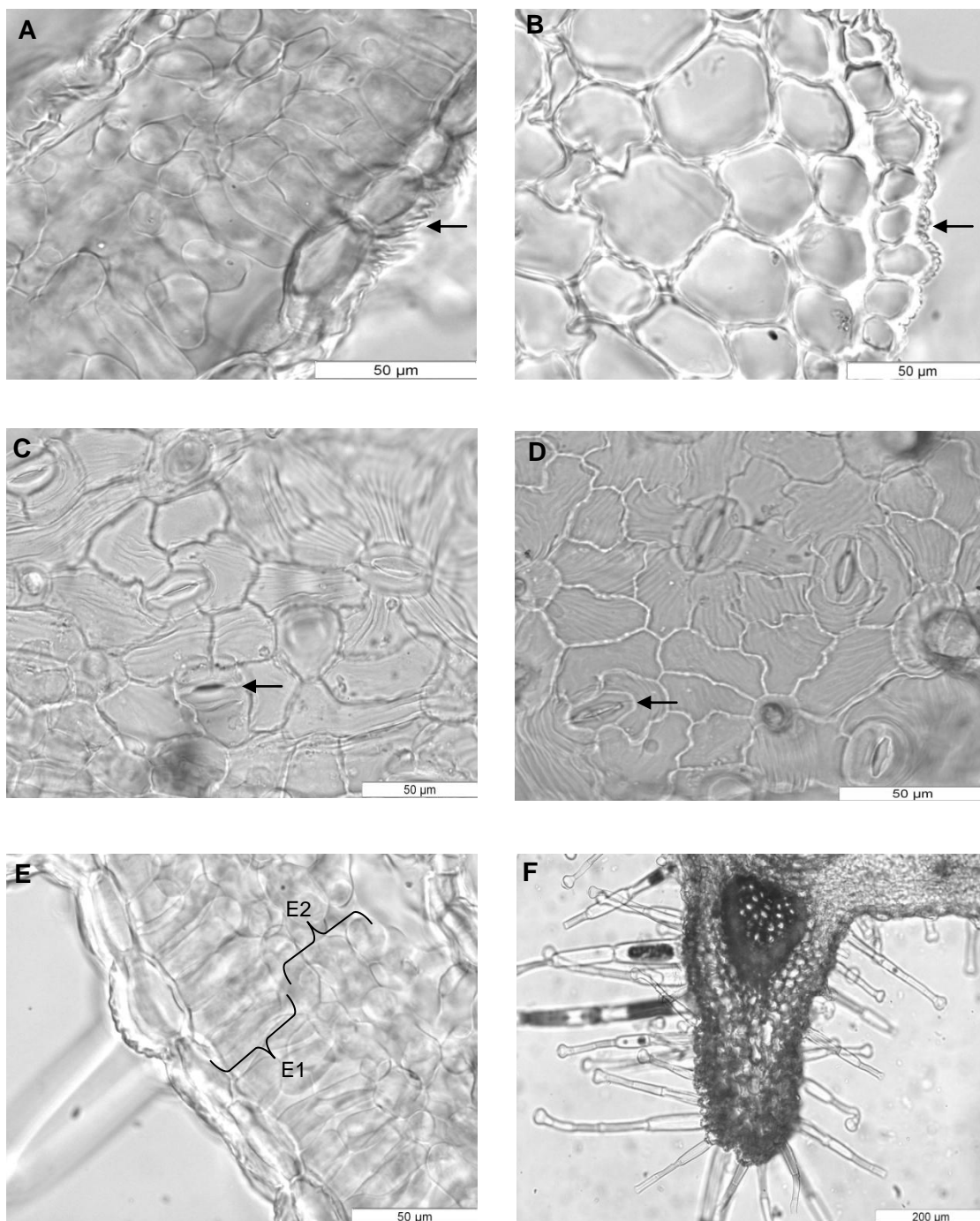


Fig.18 - Híbrido (MO): **A** - Cutícula (seta) da página superior da folha em corte transversal (barra de escala: 50µm); **B** - Cutícula (seta) da página inferior da folha em corte transversal (barra de escala: 50µm); **C** -Epiderme da página superior da folha (barra de escala: 50µm); **D** - Epiderme da página inferior da folha evidenciando estoma (seta) (barra de escala: 50µm); **E** - Corte transversal da folha com parênquima clorofilino em paliçada (seta preta) e parênquima lacunoso (seta azul) (barra de escala: 50µm); **F** - Corte transversal da nervura principal (barra de escala: 200µm).

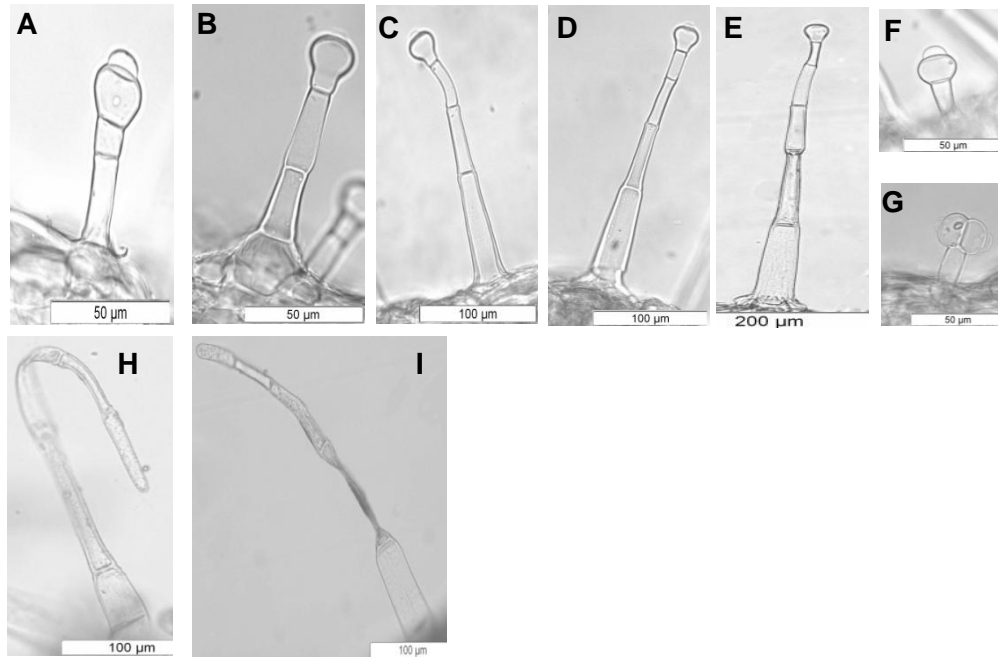


Fig.19 – Híbrido (MO): Tricomas secretores de pé pluricelular e cabeça unicelular, com pé de 2 células (**A, B**) (barra de escala: 50µm), de 3 células (**C**) (barra de escala: 50µm), de 4 células (**D**) (barra de escala: 100µm), de 5 células (**E**) (barra de escala: 200µm); Tricomas secretores de pé unicelular e cabeça unicelular (**F**) (barra de escala: 50µm) e bicelular (**G**) (barra de escala: 50µm); Tricomas tectores curvos (**H**) e colapsados (**I**) (barra de escala: 100µm).

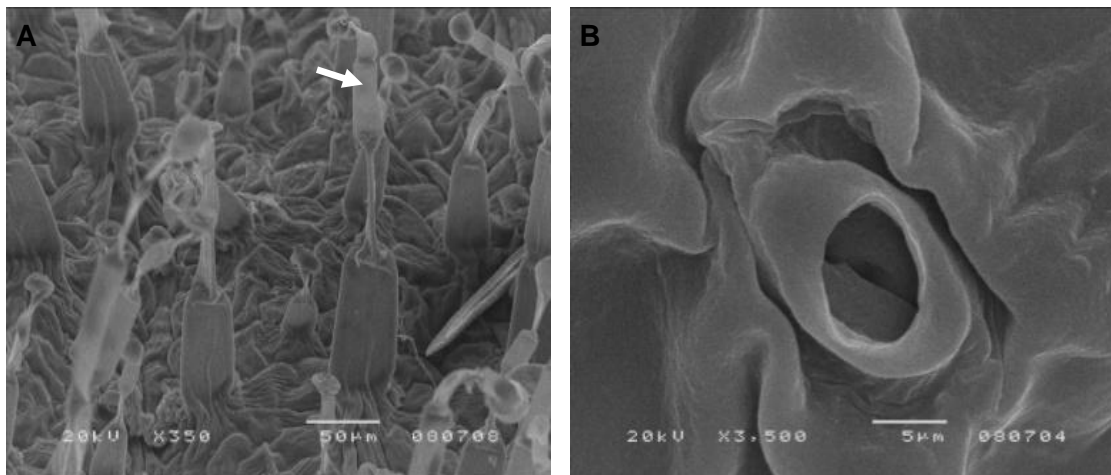


Fig. 20 – Híbrido (MEV): **A** - Pormenor da superfície da epiderme inferior evidenciando tricomas secretores colapsados (seta) (barra de escala: 50µm); **B** - Pormenor de estoma anomocítico (barra de escala: 5µm).

Tabela 3 - Características morfológicas observadas na folha, cálice e corola de *Digitalis purpurea* (DP), *Digitalis thapsi* (DT) e Híbrido (H).

	DP	DT	H
Folha			
Dimensão	Comp.: 13-15 cm Largura: 4-6 cm	Comp.: 10-15 cm Largura: 4-6 cm	Comp.: 13-20 cm Largura: 5-7 cm
Coloração página superior	Verde-escuro	Verde amarelado	Verde-escuro
Coloração página inferior	Verde cinza	Verde amarelado	Verde-claro
Limbo	Decorrente Ovado Dentado	Decorrente Lanceolado Serrado	Decorrente Lanceolado Serrado
Cálice			
Sépalas	5-6 largas Concrescentes na base Imbricadas Tamanho desigual	5 estreitas Concrescentes na base Tamanho igual	5-6 estreitas Livres Imbricadas Tamanho desigual
Corola			
Forma	Tubuloso - campanulada Pubescente	Tubuloso- campanulada Reentrância curvilínea em S Pubescente	Tubuloso- campanulada Reentrância curvilínea em S Pubescente
Cor	Purpura	Rosácea	Rosa-escuro
Máculas	Internas Vermelho-escuro a púrpura intenso Dominância de mác. grandes	Internas Rosa Pequena dimensão	Internas Rosa-escuro Sem dominância

Tabela 4 - Parâmetros médios da anatomia foliar observados em *Digitalis purpurea* (DP), *Digitalis thapsi* (DT) e Híbrido (H).

Parâmetros	DP	H	DT
Cutícula ep. sup.(µm)	3,28 (0,33) a	7,80 (0,93) b	7,15 (1,70) b
Cutícula ep. inf. (µm)	2,79 (0,33) a	8,62 (0,96) b	8,74 (0,64) b
Mesófilo total (µm)	109,69 (7,86) a	105,16 (3,24) a	282,60 (60,30) b
Parênquima paliçada (µm)	41,95 (5,50) a	41,24 (1,24) a	106,02 (45,85) b
Parênquima lacunoso (µm)	67,75 (9,53) a	58,42 (2,93) a	110,73 (58,04) b
Nº de células ep. sup.	799*	2984,60 (494,47) a	1691,30 (262,30) b
Células ep. Sup (C) (µm)	43,76 (7,58) a	25,87 (9,36) b	27,75 (1,62) b
Células ep. sup (L) (µm)	27,01 (8,37) a	16,35 (4,92) b	19,84 (5,39) b
Células ep. sup (C/L)	1,62 (11,85) a	1,58 (6,73) a	1,40 (5,59) b
Nº de células ep. inf.	1101*	2414,50 (401,13) a	1245,30 (225, 50) b
Células ep. inf (C) (µm)	37,31 (5,42) a	31,37 (6,03) a	23,94 (4,65) b
Células ep. Inf (L) (µm)	19,79 (6,23) a	17,54 (3,12) a	17,75 (3,96) a
Células ep. inf. (C/L)	1,89 (12,39) a	1,78 (9,77) a	1,35 (4,38) b
Estomas ep. sup (C) (µm)	20 (2,44) a	20,69 (2,79) a	20,20 (1,52) a
Estomas ep. sup (L) (µm)	15,68 (1,01) a	15,29 (1,68) a	15,69 (1,83) a
Estomas ep. Sup C/L	1,28 (3,05) a	1,35 (3,82) b	1,28 (3,19) a
Nº de estomas ep. sup.	30*	54,60 (33,51) a	49,30 (34,44) b
Estomas ep. inf (C) (µm)	23,88 (6,35) a	19,49 (3,06) b	20,98 (1,06) c
Estomas ep. inf (L) (µm)	15,33 (4,71) a	16,11 (3,46) b	15,11(1,02) a
Estomas ep. Inf C/L	1,56 (6,05) a	1,21 (2,39) b	1,39 (4,16) c
Nº de estomas ep. inf.	193*	195,80 (65,13) a	138,60 (57,23) b
Índice estomático pág. sup	3,70* a	1,79 (1,29) b	3,81 (1,39) a
Índice estomático pág. inf	12,20* a	7,50 (1,73) b	7,65 (2,82) b
Relação numérica de estomas de ambas as páginas	1:6,4*	1:3	1:2,5

Em cada linha as letras diferentes indicam – diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$). Entre parêntesis – erro padrão da média; L = Largura; C = Comprimento; Valores médios de 10 observações. * Dados de Martinez (1946).

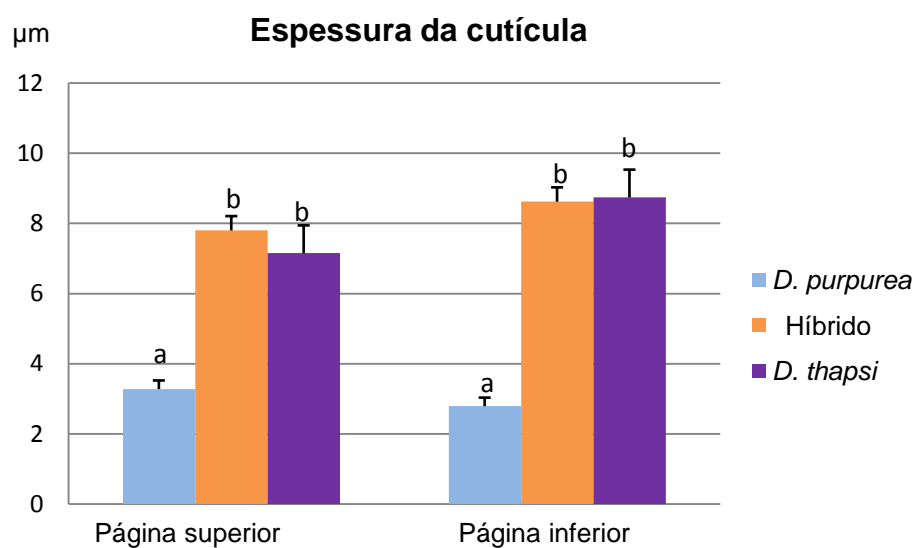


Figura 21 - Comparação estatística da espessura média da cutícula (μm) de ambas as páginas para *D. purpurea*, Híbrido e *D. thapsi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$).

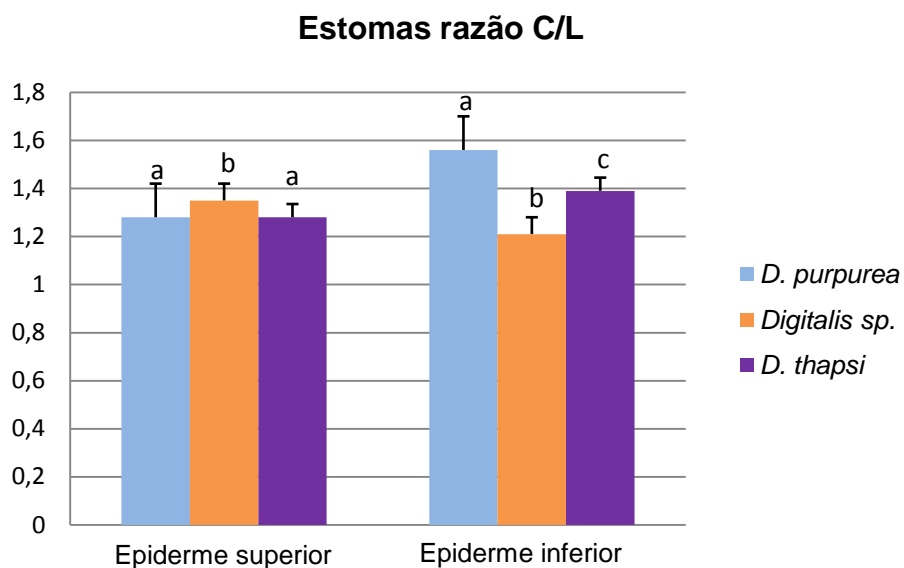


Figura 22 - Comparação estatística da razão comprimento / largura médios para *D. purpurea*, Híbrido e *D. thapsi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$).

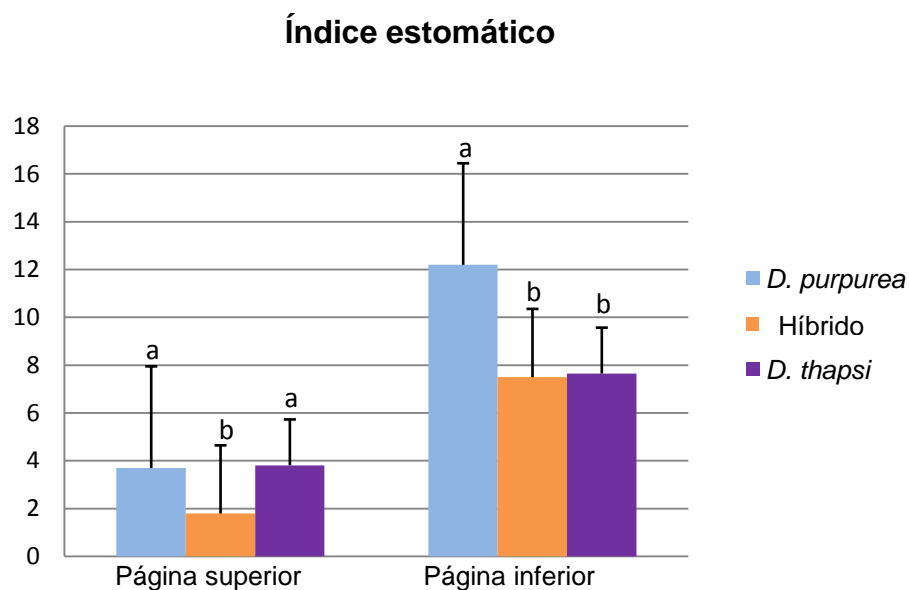


Figura 23 - Comparação estatística do índice estomático para *D. purpurea*, Híbrido e *D. thapsi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$).

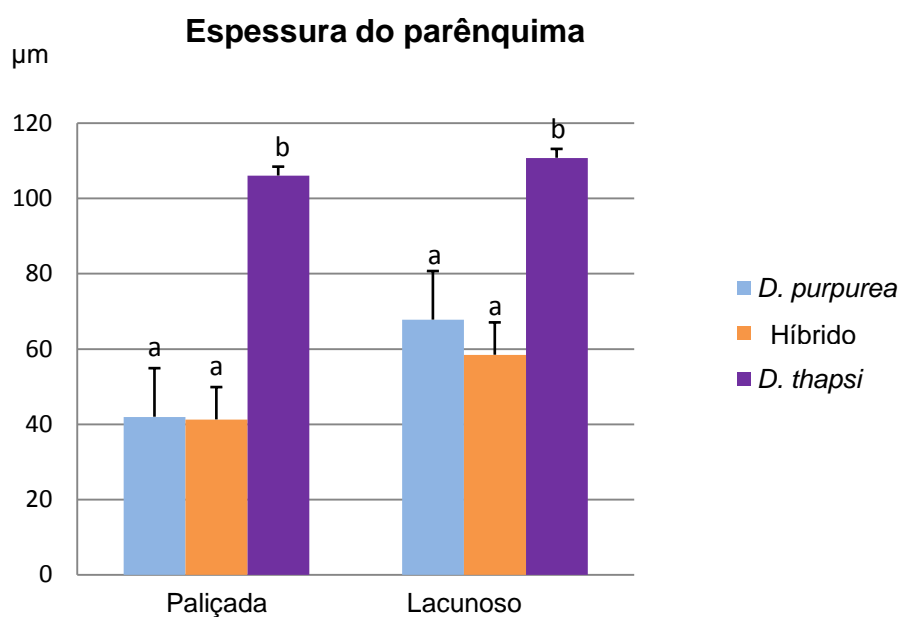


Figura 24 - Comparação estatística da espessura média do parênquima (μm) em paliçada e lacunoso para *D. purpurea*, Híbrido e *D. thapsi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Tipos de tricomas encontrados em *Digitalis purpurea* L. (DP), *Digitalis thapsi* L. (DT) e Híbrido (H). É indicada a presença (✓) ou ausência (X) de cada tipo de tricomas.

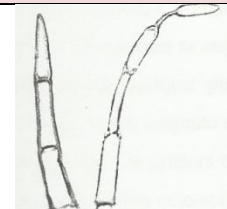
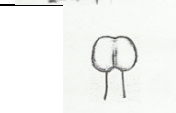


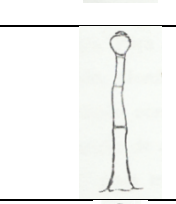
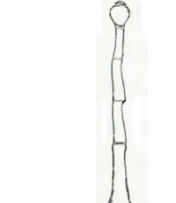
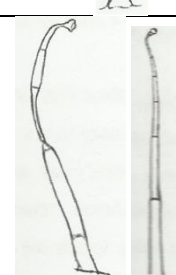
Tipo de tricomas	Representação	DP	DT	H
Tectores		✓	✓ (raros)	✓
Secretores de cabeça bicelular		✓	✓	✓
Secretores de cabeça e pé unicelulares		✓	✓	✓
Secretores de cabeça unicelular e pé formado por 2 células		✓	✓	✓
Secretores de cabeça unicelular e pé formado por 3 células		✓	✓	✓
Secretores de cabeça unicelular e pé formado por 4 células		✓	✓	✓
Secretores de cabeça unicelular e pé formado por 5 ou mais células		X	✓	✓

Tabela 6 - Dimensões médias para os tricomas presentes em *Digitalis purpurea* L. (DP), *Digitalis thapsi* L. (DT) e Híbrido (H).

	DP		H		DT	
Tricomas	Pedicelo (µm)	Cabeça C/L	Pedicelo (µm)	Cabeça C/L	Pedicelo (µm)	Cabeça C/L
Pedicelo c/1célula e Cabeça unicelular (1)	20,46 (1,41) a	1,47 (0,05) a	19,34 (1,67) a	0,87 (0,05) b	18,92 (0,99) b	1,55 (0,11) a
Pedicelo c/2células e Cabeça unicelular (3)	41,29 (0,78) a	0,86 (0,01) a	59,49 (2,06) b	0,79 (0,02) b	73,22 (1,10) c	1,02 (0,01) c
Pedicelo c/3células e Cabeça unicelular (4)	145,77 (6,88) a	0,82 (0,08) a	308,71 (19,84) b	1,05 (0,05) b	123,68 (1,89) c	1,05 (0,01) b
Pedicelo c/4células e Cabeça unicelular (5)	416,17 (5,70) a	0,86 (0,01) a	486,15 (31,41) b	1,32 (0,42) b	539,23 (4,33) c	1,60 (0,02) c
Pedicelo c/5células e Cabeça unicelular (6)	—	—	910,66 (35,39) a	1,08 (1,32) a	224,72 (3,33) b	0,78 (0,99) b
Pedicelo c/1célula e Cabeça bicelular (2)	41,91 (1,86) a	0,97 (0,01) a	30,66 (5,84) b	0,74 (0,04) b	6,86 (0,35) c	1,01 (0,00) c
Tectores (7)	518,32 (96,84) a	—	254,29 (1,53) b	—	—	—

Em cada linha as letras diferentes indicam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$) Entre parêntesis – erro padrão da média; L = Largura; C = Comprimento; Valores médios de 10 observações. Os números () são referentes às respectivas barras na Figura 25.

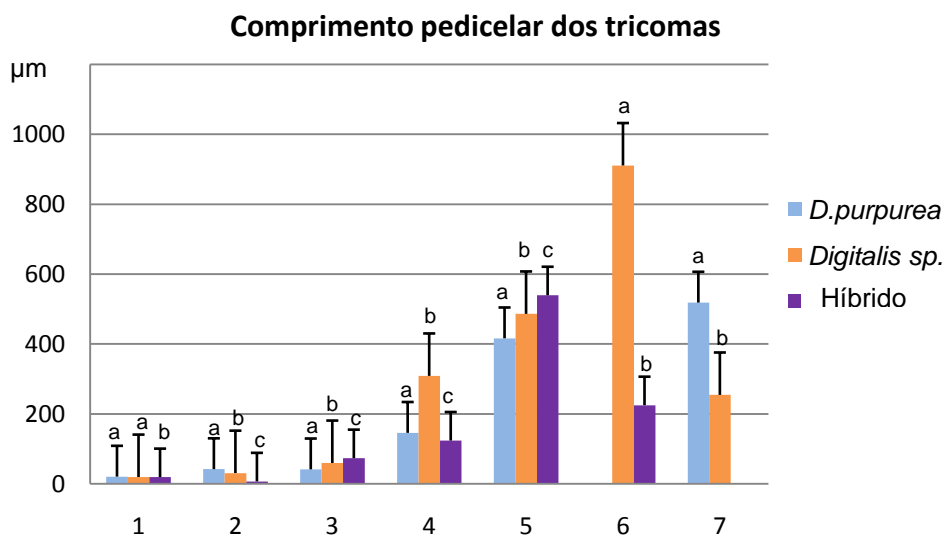


Figura 25 - Comparação estatística do comprimento pedicelar médio (µm) dos vários tipos de tricomas presentes em *D. purpurea*, Híbrido e *D. thapsi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$).

7. Discussão

Os resultados obtidos através da análise macroscópica (Tabela 3), permitem-nos reter que existem divergências entre os três exemplares para a forma, recorte, dimensão, coloração e indumento da folha, morfologia do cálice e forma e coloração da corola.

No que concerne à folha, constata-se que a espécie *D. purpurea* apresenta folhas ovadas e crenadas, enquanto o híbrido exhibe folhas lanceoladas e serradas. Também apresentam diferenças relativas ao comprimento e largura das folhas. No entanto, a dimensão das folhas é uma característica que varia com as condições ambientais, pelo que possui um valor taxonómico limitado (Metcalf & Chalk, 1950). A tonalidade do limbo também varia entre os exemplares, apresentando *D. purpurea* uma coloração verde-escuro na página superior e verde cinza na inferior, enquanto *D. thapsi* manifesta uma coloração verde amarelado em ambas as páginas. Por sua vez, o híbrido exhibe uma coloração verde-escuro na página superior e verde claro na inferior. No que diz respeito ao indumento, todos os exemplares apresentam folhas pubescentes, principalmente na página inferior e na nervura central. As folhas de *D. purpurea* são suaves ao tato, em oposição às de *D. thapsi* que são glutinosas devido à presença de secreções à superfície e são revestidas por um indumento amarelado. Por sua vez, as folhas do híbrido não são nem excessivamente macias nem glutinosas. As características identificadas para as folhas de *D. purpurea* e *D. thapsi* estão de acordo com os dados de Castroviejo (2009) e Da Graça (1967).

Todos os exemplares apresentam cálice pubescente, no entanto variam quanto à coloração, número e tamanho das sépalas. *D. purpurea* exhibe um conjunto de 5-6 sépalas largas, de coloração verde e rebordo avermelhado, concrescentes na base e imbricadas, sendo uma delas mais curta e estreita, enquanto *D. thapsi* apresenta cálice com 5 sépalas de coloração verde-amarelado, de igual tamanho, estreitas e concrescentes na base. O híbrido apresenta sépalas de coloração verde-escuro com rebordo arroxado, de comprimento desigual, imbricadas, estreitas e concrescentes na base. A Flora Ibérica e Da Graça, descrevem o cálice de *D. thapsi* como tendo 5 sépalas, sendo uma delas mais curta e estreita, o que não se verificou com os nossos exemplares da espécie.

Em relação à corola, verifica-se de imediato divergências entre os exemplares no que diz respeito à coloração e à forma, o que está de acordo com Braüchler (2004). *D. purpurea* manifesta uma corola de tonalidade púrpura, característica da espécie, enquanto *D. thapsi* apresenta uma coloração rosácea. Por sua vez, o híbrido manifesta uma coloração rosa escuro, intermédia relativamente às outras espécies. Ao nível das máculas, verifica-se que *D. purpurea* apresenta máculas de grande e média dimensão, com dominância de pontuações de grande dimensão. Por sua vez, *D. thapsi* apresenta máculas pequena dimensão, enquanto o híbrido manifesta ambos os tipos de pontuações (grandes e pequenas), sem dominância. A mancha que rodeia as máculas também é diferente entre os exemplares, apresentando *D. purpurea* uma mancha branca amarelada que rodeia cada mácula, enquanto que em *D. thapsi* e no híbrido há uma única mancha que abrange todas as máculas, sendo a mancha de coloração amarelada em *D. thapsi* e branca no híbrido. Em relação à forma da corola, todos os exemplares apresentam a corola tubuloso-campanulada, no entanto verifica-se em *D. thapsi* uma reentrância curvilínea próxima do cálice, que confere à corola um aspeto de S. Este dado está de acordo com Da Graça (1967). O híbrido também manifesta esta característica, mas de forma menos acentuada. Ainda ao nível da flor, verifica-se que em *D. thapsi* estas são suportadas por um pedicelo longo, que excede o comprimento do cálice. No híbrido, as flores também são suportadas por um pedicelo, no entanto este é menor que o comprimento do cálice. Em *D. purpurea* a inserção das flores ocorre diretamente na haste floral. Também se verificam diferenças entre os exemplares durante o desenvolvimento dos botões florais, distinguindo-se *D. purpurea* por apresentar sempre botões de coloração púrpura por oposição ao que ocorre em *D. thapsi*, que apresenta botões variegados de coloração rosa escuro e amarelo. O híbrido apresenta botões variegados de rosa e amarelo. Esta característica relativa aos botões florais não se encontra referenciada na literatura.

Como já referido, Gonçalo Sampaio, em Flora Portuguesa (1919), menciona a existência de um híbrido entre *D. purpurea* x *D. thapsi*, cujas características não se encontram de acordo com as obtidas neste trabalho para o híbrido.

Pela análise dos resultados microscópicos, das Tabelas 4 a 6, e das Figuras 21 a 25, verifica-se a existência de diferenças qualitativas e quantitativas nos

exemplares em estudo ao nível da forma e espessura da cutícula, no número de camadas do parênquima clorofilino em paliçada e lacunoso, na nervura principal e nos tricomas.

Em corte transversal, verifica-se ao nível da cutícula, que *D. purpurea* apresenta uma cutícula lisa em ambas as páginas, enquanto *D. thapsi* e o híbrido possuem uma cutícula reticulada. Existem também diferenças significativas em relação à espessura da cutícula, como se pode verificar pela análise da Figura 21. *D. thapsi* apresenta 7,15 μm de espessura para a epiderme superior e 8,74 μm para a inferior, e o híbrido 7,80 μm e 8,62 μm respetivamente, valores muito semelhantes em ambas as espécies, mas que diferem dos valores obtidos para *D. purpurea*, com uma cutícula muito menos espessa, com 3,28 μm e 2,79 μm (Tabela 4). Estes resultados também se verificaram no estudo de Martinez (1946) para *D. thapsi* e *D. purpurea*, apesar dos valores da espessura da cutícula serem relativamente diferentes.

Todas as espécies em estudo apresentam semelhança ao nível das células epidérmicas, que são de forma poligonal na epiderme superior e irregular na inferior. No entanto, verifica-se que a razão comprimento / largura das células em ambas as epidermes é muito semelhante em *D. purpurea*, 1,62 para a superior e 1,89 para a inferior, e no híbrido, com 1,58 e 1,78. Estes valores são superiores aos apresentados por *D. thapsi*, com 1,40 e 1,35, respetivamente (Tabela 4). Estes resultados sugerem que as células epidérmicas de *D. thapsi* são de menor dimensão em ambas as páginas. No entanto, de acordo com Metcalfe e Chalk (1979) por vezes as características da cutícula e das células da epiderme podem oferecer uma grande variabilidade dentro de um mesmo *taxon*.

No que diz respeito aos estomas, atendendo à forma e disposição das células que os rodeiam, são do tipo anomocítico para os três exemplares. Existem diferenças quantitativas rácio comprimento / largura dos estomas (Tabela 4), como se pode comprovar ao analisar a Figura 22. Verifica-se para a epiderme superior que o híbrido apresenta estomas ligeiramente maiores, 1,35 μm , que *D. purpurea* e *D. thapsi*, ambas com 1,28 μm . Para a epiderme inferior existem diferenças entre os três *taxa*, sendo *D. purpurea* a que apresenta estomas de maior dimensão, com 1,56 μm . Em relação ao índice estomático (IE) (Tabela 4), verifica-se que o IE para a epiderme superior é semelhante para *D.*

purpurea, 3,70, e *D. thapsi*, 3,81, sendo superiores em relação ao IE do híbrido, 1,79. Para a epiderme inferior verifica-se o contrário, isto é, *D. thapsi*, 7,65, e o híbrido, 7,50, apresentam IE semelhante, muito inferior ao de *D. purpurea*, 12,20, como se verifica na Figura 23. O IE determinado para *D. thapsi* em ambas as páginas é muito semelhante ao obtido por Martinez (1946), no entanto quando comparado com os obtidos por Da Graça (1967), existem ligeiras discrepâncias. Segundo Metcalfe e Chalk (1979), o índice estomático pode ser considerado um bom carácter taxonómico, uma vez que é independente do habitat, da idade da planta e da região da planta estudada. Através da relação numérica dos estomas (Tabela 4) verifica-se que *D. purpurea* é a que apresenta maior abundância de estomas na página inferior, o que está de acordo com o IE obtido para esta página. O valor da relação numérica para *D. thapsi*, 1:2,5, é semelhante ao de Martinez (1946), 1:2,4, e Da Graça (1967), 1:2,4.

O mesófilo é bifacial para as três espécies, constituído por um parênquima clorofilino em paliçada junto à epiderme da página superior e um parênquima clorofilino lacunoso junto à epiderme da página inferior. No entanto, verificam-se diferenças no número de camadas que constituem ambos os parênquimas, o que condiciona a espessura total do mesófilo. Para o parênquima em paliçada, *D. purpurea* apresenta uma camada de células, *D. thapsi* três e o híbrido um número intermédio, duas camadas. Ao nível da espessura (Tabela 4), verifica-se que *D. thapsi* é a que apresenta maior dimensão, 106,02 µm, o que era esperado tendo em conta que apresenta maior número de camadas, (Fig. 24). No entanto, o mesmo não se verifica para o híbrido, que apresenta duas camadas e espessura de 41,24 µm, que é semelhante a *D. purpurea* de 41,95 µm, que apenas apresenta uma camada de células.

Relativamente ao parênquima lacunoso, *D. purpurea* e o híbrido apresentam três a quatro camadas de células e espessura semelhante, 67,75 µm e 58,42 µm, respectivamente. *D. thapsi* possui quatro a cinco e é a que apresenta maior espessura, 110,73 µm, como se pode verificar na Figura 24. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Martinez (1946). *D. thapsi* é o *taxon* que apresenta maior dimensão total do mesófilo foliar, 282,60 µm, com um valor cerca de duas vezes superior aos outros exemplares em estudo, que

apresentam valores próximos, 109,69 µm para *D. purpurea* e 105,16 µm para o híbrido.

Ao nível da nervura principal, verifica-se uma maior abundância de tricomas na página inferior para as três espécies. Esta característica é confirmada por Martinez (1946) para *D. purpurea* e *D. thapsi*. A nervura principal em *D. purpurea* apresenta grande abundância de tricomas, todos enrolados entre si, com dominância de tricomas tectores. *D. thapsi* apresenta tricomas secretores e livres, e o híbrido, tricomas livres com dominância dos secretores.

Em *D. purpurea* é possível encontrar tricomas tectores, sendo os mais comuns os de três a cinco células de paredes delgadas e pontuadas, com a célula terminal alongada e de extremidade arredondada, verificando-se muitas vezes curvos e colapsados. Também se encontram tricomas secretores de pedicelo pluricelular de duas, três ou quatro células e cabeça unicelular, e de pedicelo unicelular e cabeça unicelular ou bicelular. Em *D. thapsi* existem tricomas secretores de pedicelo pluricelular de duas, três, quatro, cinco ou mais células e cabeça unicelular, e de pedicelo unicelular e cabeça unicelular ou bicelular. O híbrido apresenta tricomas tectores semelhantes aos de *D. purpurea* e os mesmo tricomas secretores que existem em *D. thapsi* (Tabela 5). Verificou-se a presença de um tricoma secretor de cabeça bicelular nas duas espécies e no híbrido, que se encontrava quase sempre localizado na zona correspondente à nervura, mas na página superior. Em relação a esta característica, não se encontraram referências na literatura, mas a persistência deste tricoma pode ser um dado importante a ter em conta. Os dados obtidos para o tipo de tricomas encontra-se de acordo com os dados de Martinez (1946) e Da Graça (1967). Pela análise da Tabela 6, verifica-se que existem diferenças para um mesmo tipo de tricomas em relação ao comprimento pedicelar médio e à razão comprimento / largura médios da cabeça (Tabela 6).

Para tricomas de cabeça e pedicelo unicelular, *D. purpurea* e o híbrido apresentam comprimento pedicelar semelhante, no entanto, o híbrido possui tricomas de cabeça mais pequena. Por sua vez, *D. thapsi* apresenta este tipo de tricomas mais curtos.

Verifica-se que os tricomas de cabeça unicelular e pedicelo de duas células, apresentam maior comprimento pedicelar e razão comprimento / largura da cabeça em *D. thapsi*.

Os tricomas de cabeça unicelular e pedicelo constituído por três células, manifestam pedicelo mais comprido no híbrido. Para a razão comprimento / largura da cabeça, *D. purpurea* é a que apresenta tricomas de cabeça de menor dimensão.

Para tricomas de cabeça unicelular e de pedicelo com quatro células, *D. thapsi* é a que apresenta tricomas de maior dimensão.

Os tricomas de cabeça unicelular e de pedicelo constituído por cinco ou mais células, presentes apenas em *D. thapsi* e no híbrido., são de maior dimensão no híbrido.

Para tricomas de cabeça bicelular e de pedicelo unicelular, presentes nas três espécies, verifica-se que o comprimento pedicelar é muito inferior em *D. thapsi* comparativamente às outras espécies.

Relativamente aos tricomas tectores, *D. purpurea* apresenta tricomas com o dobro do comprimento pedicelar verificado no híbrido.

Em relação aos tricomas, os dados obtidos sugerem que de facto existem diferenças significativas entre as espécies em estudo, nomeadamente para o comprimento do pedicelo, mas torna-se difícil estabelecer um padrão entre elas (Fig.25).

II Abordagem Molecular

2.1 Evolução da Biologia Molecular

Foram os estudos efetuados por Mendel que impulsionaram o aparecimento de novas descobertas na área da Genética, entre as quais a ligação génica, que precedeu e propiciou a construção de mapas de ligação. Considerando esses princípios e baseando-se em conceitos formulados sobre a relação gene/enzima com a estrutura física e hereditária da molécula de ADN, têm-se utilizado as variações entre genótipos dentro de uma espécie para análise genética e construção de mapas genéticos (MEZA, 2002).

Apesar da inquestionável contribuição proveniente destes trabalhos, a utilização deste tipo de marcadores é restrita, pois tem por base genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Marcadores fenotípicos são fáceis de serem identificados, mas em alguns casos difíceis de serem avaliados com precisão, principalmente por causa da interferência do meio ambiente ou de genes modificadores (MOREIRA, 2004).

Com o advento da tecnologia de ADN recombinante, resultante do desenvolvimento de técnicas modernas em biologia molecular, surgiram novos métodos para análise que aumentaram o poder de deteção da variabilidade existente diretamente no ADN (MEZA, 2002).

O aparecimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase) na década de 80, desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, permitindo a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de ADN (MOREIRA, 2004).

Com a PCR, um processo automatizado, consegue-se uma amplificação fácil, muito rápida e seletiva de fragmentos de ADN específicos, o que a torna uma técnica particularmente importante para estudos genéticos e moleculares (VIDEIRA, 2001; SOUZA, 2006). No entanto, é considerado um método de análise de grande sensibilidade, sendo necessário efetuá-lo com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar os resultados. Fatores como a qualidade e a concentração de ADN, a concentração de $MgCl_2$, o conteúdo

de G+C, o tamanho do *primer* e a temperatura de emparelhamento podem também afetar a reprodutibilidade dos resultados. Ainda em termos de limitações deste método, refere-se o fato de a *Taq* polimerase não ter capacidade para corrigir erros associados às DNA polimerases (atividade de exonuclease 3'-5') e a incapacidade de obtenção de marcadores moleculares desconhecidos distribuídos pelo genoma (VIDEIRA, 2001; SOUZA, 2006).

Os avanços que ocorreram em 1990 na área de marcadores moleculares baseados em PCR, impulsionaram o aparecimento de novas técnicas, através da ideia de se utilizar *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio da sequência (SOUZA, 2006).

Assim sendo, a investigação em biologia molecular é relativamente recente e muito do que hoje sabemos nesta área foi impulsionado por vários pesquisadores e suas descobertas, fundamentais para o estabelecimento e desenvolvimento da biologia molecular como ciência. As técnicas moleculares são hoje aplicáveis a várias áreas, desde a biologia humana, especialmente relacionadas com o estudo da medicina forense e doenças genéticas, à biologia animal e das plantas, associada a estudos de conservação, taxonômicos e de melhoramento. Pela primeira vez, a variação encontrada em plantas ou animais pode ser analisada ao nível do ADN e descrita com um grau de precisão impraticável há pouco tempo atrás.

2.2 Marcadores Moleculares

Atualmente existem vários métodos para análise da diversidade molecular em espécies animais e vegetais, que derivam e evoluíram a partir da técnica da PCR, e variam quanto à habilidade para detetar diferenças entre indivíduos, populações e espécies, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Estas técnicas abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de ADN, através de marcadores moleculares (MOREIRA, 2004).

Os marcadores moleculares são fragmentos específicos de ADN que podem ser identificados ao longo do genoma. Existem várias classes de marcadores, entre os quais se salientam três: as isoenzimas, os polimorfismos baseados na

hibridização (RFLPs, *Restriction Fragment Length Polymorphisms* e VNTRs, *Variable Number of Tandem Repeats*) e os polimorfismos baseados no PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), os ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeat*) e os AFLPs (*Amplified Fragments Length Polimorphisms*) (MENDES, 2007).

Por detetarem variações genéticas, os marcadores moleculares podem fornecer informações úteis a diferentes níveis: estrutura da população, relações filogenéticas, padrões de biogeografia histórica e análises de ascendência e parentesco (MENDES, 2007).

2.3 Marcadores RAPD

Os RAPDs (Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente) foram descritos pela primeira vez por Williams e colaboradores em 1990. Estes investigadores utilizaram pequenos *primers* com sequências aleatórias de nucleótidos (10 nucleótidos) e observaram que estes eram capazes de amplificar segmentos de ADN genómico de várias espécies e gerar polimorfismos (WELSH & MCCLELLAND, 1990; MENDES, 2007).

Os polimorfismos detetados com este tipo de marcadores podem ocorrer devido a deleções na sequência de ligação do *primer* ao ADN (impedindo deste modo a amplificação do fragmento) e inserções ou deleções entre duas sequências de emparelhamento adjacentes (levando à amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos) (LACERDA *et al.*, 2002; MENDES, 2007). A variação genética e as divergências dentro e entre *taxa* são analisadas pela presença ou ausência de uma banda, que é resultante de alterações na sequência de ADN num determinado *locus* (MENDES, 2007).

A técnica de RAPD é baseada na amplificação de segmentos múltiplos e aleatórios do ADN genómico. Tem a vantagem de usar pequenas quantidades de ADN, não requer conhecimento prévio do genoma e fornece um grande número de marcadores, permitindo uma análise genética rápida dos organismos (HADRYIS *et al.*, 1992). Devido ao fato de não necessitar de clonagem, sequenciação de nucleotídeos ou hibridação, tem permitido a deteção rápida e efetiva dos polimorfismos e de marcadores genéticos num grande número de plantas e animais (MOREIRA, 2004).

É uma técnica simples, rápida, de baixo custo, necessita apenas de pequenas quantidades de material (LACERDA *et al.*, 2002). Como necessita de uma pequena quantidade de ADN, torna-se uma técnica muito útil para o estudo genético de plantas, pois é difícil obter grandes quantidades de ADN de boa qualidade para as amplificações em muitas espécies (MENDES, 2007). Os RAPDs detetam um elevado número de polimorfismos em todo o genoma, mesmo em zonas não codificantes, permitindo assim estabelecer relações entre indivíduos e populações de uma determinada espécie (LACERDA *et al.*, 2002). Apesar das vantagens, apresenta algumas limitações como o baixo conteúdo de informação genética por loco, o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD e a sua baixa repetibilidade (SANTOS, 1994; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2006).

Os marcadores RAPD têm sido amplamente utilizados para análise genética de plantas, nomeadamente para avaliar a variabilidade intra e interpopulacional, para o mapeamento genético e para identificar marcadores ligados a genes com interesse. Também tem sido utilizado para identificação de híbridos em várias espécies de plantas, incluindo o girassol, o pessegueiro, o algodoeiro, o arroz e o café (ELISIÁRIO *et al.*, 1999; ALI *et al.*, 2008).

2.4 Aplicação de marcadores RAPD no género *Digitalis* L.

Um dos primeiros estudos conhecidos relativos à aplicação de marcadores RAPD no género *Digitalis* L. foi efetuado por Nebauer e colaboradores (1999), para determinar os níveis e os padrões de diversidade genética de seis populações de *Digitalis obscura* L. da Península Ibérica. De acordo com os resultados, verificou-se uma maior variação individual dentro das populações. Trata-se do primeiro estudo que avaliou a variabilidade genética dentro e entre populações de *Digitalis obscura* L., fornecendo dados importantes para a otimização de estratégias de amostragem desta espécie medicinal.

O mesmo autor realizou um estudo posterior, (NEBAUER *et al.*, 2000), para avaliar a viabilidade da aplicação deste tipo de marcadores na determinação das relações genéticas entre seis espécies de *Digitalis*: *D. obscura*, *D. lanata*, *D. grandiflora*, *D. purpurea*, *D. thapsi*, *D. dubia* e *D. excelsior*, um híbrido entre *D. purpurea* x *D. grandiflora*. Os dados obtidos por RAPD foram concordantes

com os dados estabelecidos com base em afinidades morfológicas. Esta técnica revelou ser uma ferramenta importante, tendo fornecido informações para o estabelecimento de relações taxonómicas entre as espécies em estudo. Sales e colaboradores (2001), analisaram a variação genética de 17 populações de *Digitalis minor*, espécie endémica das Ilhas Baleares, com ocorrência de duas variedades morfológicas distintas. Os resultados RAPD revelaram baixa variabilidade entre populações, indicando uma diferenciação restrita entre as mesmas. Não existiram diferenças significativas entre as duas variedades morfológicas, o que sugere uma falha para encontrar uma correlação entre os locos RAPD e esta característica morfológica.

O estudo conhecido mais recente foi efetuado por Boronnikova e colaboradores (2007), que utilizaram duas técnicas, RAPD e ISSR, para analisar o polimorfismo genético de duas populações de *Digitalis grandiflora* Mill., espécie relíquia iraniana. Os resultados revelaram elevado polimorfismo entre as duas populações, verificando-se maior variação genética dentro das populações.

Para além da técnica aplicada, todos estes estudos partilham que a informação obtida representa um contributo para a criação de estratégias que visem a conservação de plantas do género *Digitalis* L.

A conservação de espécies deste género é fundamental, não apenas pela importância que desempenham como plantas medicinais, mas também porque a maioria são espécies endémicas, apresentando áreas geográficas muito restritas.

O uso de marcadores RAPD-PCR tem sido aplicado com sucesso no género *Digitalis* L., pois a deteção de polimorfismos tem permitido estabelecer o grau de parentesco entre espécies e determinar a sua variabilidade entre e dentro de populações. Simultaneamente, têm sido utilizados para o estudo e identificação de híbridos em várias espécies plantas.

Como pretendemos analisar a diversidade genética entre as espécies em estudo, de modo a inferir acerca do seu parentesco para avaliar a ocorrência de hibridação, o uso de marcadores RAPD parece ser o mais indicado.

3. Material e Métodos

3.1 Material vegetal

Foram pesadas 100 mg de folhas, conservadas em câmara frigorífica a - 20° C, de 10 amostras de *D. purpurea* (P3,P4, P5, P6, P71 e P72), de *D. thapsi* (T3, T4, T5, T6, T71 e T72) e do híbrido (H3, H4, H5, H6, H71 e H72).

3.2 Extração de ADN genómico

As folhas de cada amostra foram maceradas em azoto líquido num almofariz e, posteriormente, transferidos 100 mg para tubos Eppendorf. A extração do ADN genómico foi efectuada recorrendo-se ao Kit de extração DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), seguindo-se as instruções do fornecedor, que consta no Anexo A.

3.3 Amplificação de ADN por PCR

O ADN extraído foi amplificado por PCR recorrendo ao Kit Taq PCR Master Mix (Fermentas). As reações de amplificação ocorreram num termociclador Biometra. Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%.

Todos os reagentes (conservados a -20°C) e material estéril, bem como a preparação da mistura de reação (exceto a adição do ADN) foram manuseados numa câmara previamente esterilizada.

3.4 Amplificação de RAPD

Para a deteção de polimorfismos entre os exemplares foram testados inicialmente 11 *primers*: OPA – 01, OPA – 06, OPA – 10, OPB – 07, OPC – 01, OPC – 05, OPC – 09, OPC – 12, OPE – 03, OPE – 09 e OPE – 12, cujas sequências nucleotídicas se encontram referidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Designações e sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados para detetar e promover a amplificação de regiões codificantes de genes em *Digitalis L.*

Primers	Sequência de nucleótidos (5'→ 3')
OPA 1	CAGGCCCTTC
OPA 6	GGTCCCTGAC
OPA 10	GTGATCGCAG
OPB 7	GGTGACGCAG
OPC 1	TTCGAGCCAG
OPC 5	GATGACCGCC
OPC 9	CTCACCGTCC
OPC 12	TGTCATCCCC
OPE 3	CCAGATGCAC
OPE 9	CTTCACCCGA
OPE 12	TTATCGCCCC

As misturas reacionais foram preparadas para um volume de 10µL recorrendo ao Kit Taq PCR Master Mix (2x) (Fermentas) de acordo com a Tabela 8.

Posteriormente, foram utilizados apenas os *primers* OPA – 10 e OPB – 07, cujas misturas reacionais foram preparadas para um volume de 10 µl.

A programação utilizada para a amplificação de RAPD encontra-se descrita na Tabela 9.

Tabela 8 - Componentes e respetivos volumes na mistura reacional para o conjunto de *primers*.

Componente	Volume total (10µl)
Taq PCR Master Mix (2x)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µl
Primers (10 µM)	OPA-10 / 0,5 µl OPB-7 / 0,5 µl
H ₂ O destilada estéril	3 µl
ADN	1 µl

Tabela 9 - Programa de PCR utilizado para amplificação do ADN.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	1 min.	1
Desnaturação	94	30 seg.	35
Hibridação	39	30 seg.	
Extensão	72	1 min.	
Extensão final	72	7 min.	1

3.5 Eletroforese de ADN em gel de agarose (AGE)

Os produtos PCR obtidos para os diferentes *primers* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) em 1x TBE com 5 µg/mL de brometo de etídeo, numa tina de eletroforese (Fig.26), utilizando-se uma fonte elétrica Pac300 (Bio-Rad). Nos poços do gel foram colocados 10 µL de produto amplificado e 0,1 µL de azul de bromofenol. A separação electroforética decorreu a uma voltagem constante de 175 V.

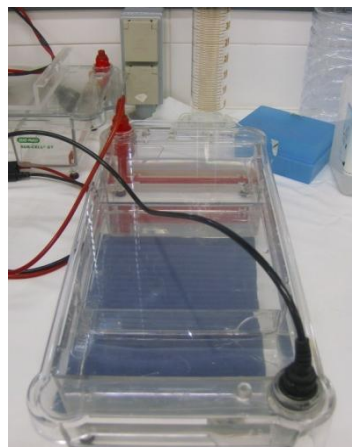


Figura 26 - Tina de eletroforese.

3.6 Análise dos géis

Os perfis eletroforéticos foram visualizados no analisador de imagens VersaDoc (Bio-Rad) (Fig.27).

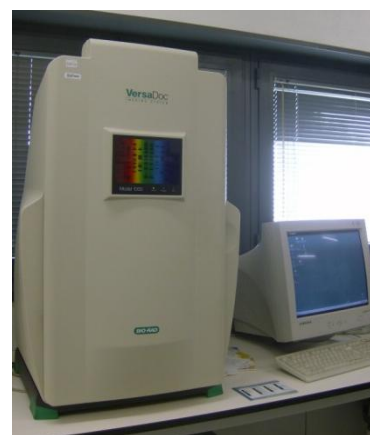


Figura 27 - Aparelho VersaDoc (Bio-Rad).

3.7 Análise de dados

Para análise dos resultados obtidos por PCR, recorreu-se a métodos de taxonomia numérica e utilizou-se o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.0 (“Applied Biostatistics Inc”). Assim, a partir da leitura dos perfis eletroforéticos foi construída uma matriz binária para os fragmentos polimórficos com presença (1) e ausência (0) de bandas. Utilizou-se para o coeficiente de semelhança, para dados qualitativos, o coeficiente de Dice. Foram construídas duas matrizes, uma para o *primer* OPB-7, que revelou um melhor perfil eletroforético, com um total de desasseies amostras e nove bandas (16x9), e uma para ambos os *primers*, OPA-10 e OPB-7, de 16x16, para verificar se o dendograma era representativo dos dados obtidos. Para ambos os casos foram retirados os valores omissos.

Posteriormente, dos vários métodos do tipo sequencial, aglomerativo, hierárquico e de não sobreposição, foi utilizado o coeficiente de SAHN (SNEATH & SOKAL, 1973), e o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) sendo estes os mais indicados para matrizes de presença/ ausência. Os resultados obtidos apresentam-se sob a forma de uma estrutura ramificada “árvores”, em que os diferentes ramos se relacionam de acordo com os valores das medidas de semelhança ou dissemelhança em que se baseou o método de agregação, dendograma ou fenograma. Foi construído um dendograma para o *primer* OPB-7 e outro para a junção de ambos os *primers*. Em seguida, calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962) entre a matriz de valores cofenéticos, que exprimem a relação de semelhança entre OTU's, implícita no dendograma, e a matriz de semelhança (ou dissemelhança). Este coeficiente de correlação cofenética indica o grau de concordância entre as duas matrizes, permitindo avaliar se o fenograma é uma representação aceitável dos dados originais.

4. Resultados

Foram testados inicialmente um total de onze *primers*, dos quais foram selecionados dois, OPA-10 (Fig.28) e OPB-7 (Fig.29), que apresentaram bandas de melhor intensidade e nitidez quando visualizado o gel de agarose. Simultaneamente, a bibliografia consultada, Nebauer *et al.* (2000), também sustenta a utilização destes *primers* no género *Digitalis* L.

Pela análise dos perfis eletroforéticos verificou-se para ambos os *primers* que *D. thapsi* e o híbrido apresentam padrões da amplificação semelhantes, mas distintos do padrão obtido para *D. purpurea*.

O *primer* OPA-10 originou um total de sete bandas, com pesos moleculares entre os 600 pb e os 2000 pb. Por sua vez, o *primer* OPB-7 originou nove bandas, com pesos moleculares entre os 400 pb e 1500 pb. (Tabela 10).

Para o *primer* OPA-10, o perfil electroforético da espécie *D. purpurea* apresentou uma banda de maior intensidade nos 600 pb. No que diz respeito a *D. thapsi*, registaram-se bandas de grande intensidade com pesos moleculares de 1300 pb e 1500 pb. Esta espécie apresentou várias bandas de menor intensidade nos 600 pb, 700 pb, 900 pb, 1000 pb e 1200 pb. O híbrido apresentou bandas de maior intensidade nos 1500 pb, verificando-se bandas de menor intensidade nos 700 pb, 900 pb, 1000 pb, 1200 pb, 2000 pb e 2500 pb. (Fig. 28)

Para o *primer* OPB-7, verificou-se que a espécie *D. purpurea* apresentou bandas de maior intensidade nos 900 pb, sendo as de menor intensidade nos 800pb e 1000 pb. A espécie *D. thapsi* apresenta bandas de maior intensidade nos 800 pb e 1500 pb, e de menor intensidade nos 400 pb, 600 pb, 850 pb, 1000 pb e 1200 pb. Verificou-se que no híbrido, as bandas localizadas nos 800 pb, 1200 pb e 1500 pb, são as que apresentam maior intensidade, observando-se bandas de menor intensidade nos 400 pb, 850 pb e 1200 pb (Fig. 29).

Verificou-se que as amostras de *D.thapsi* apresentaram variações entre elas para ambos os *primers*, nomeadamente as amostras T3, T6, T71, para o *primer* OPA-10, e T4 e T6 para o *primer* OPB-7. O mesmo se verificou para o híbrido, com as amostras H3,H4 e H6, para o *primer* OPA-10 e H3 e H6, para o *primer* OPB-7. Por sua vez, as amostras de *D.purpurea* apresentaram todas o mesmo perfil.

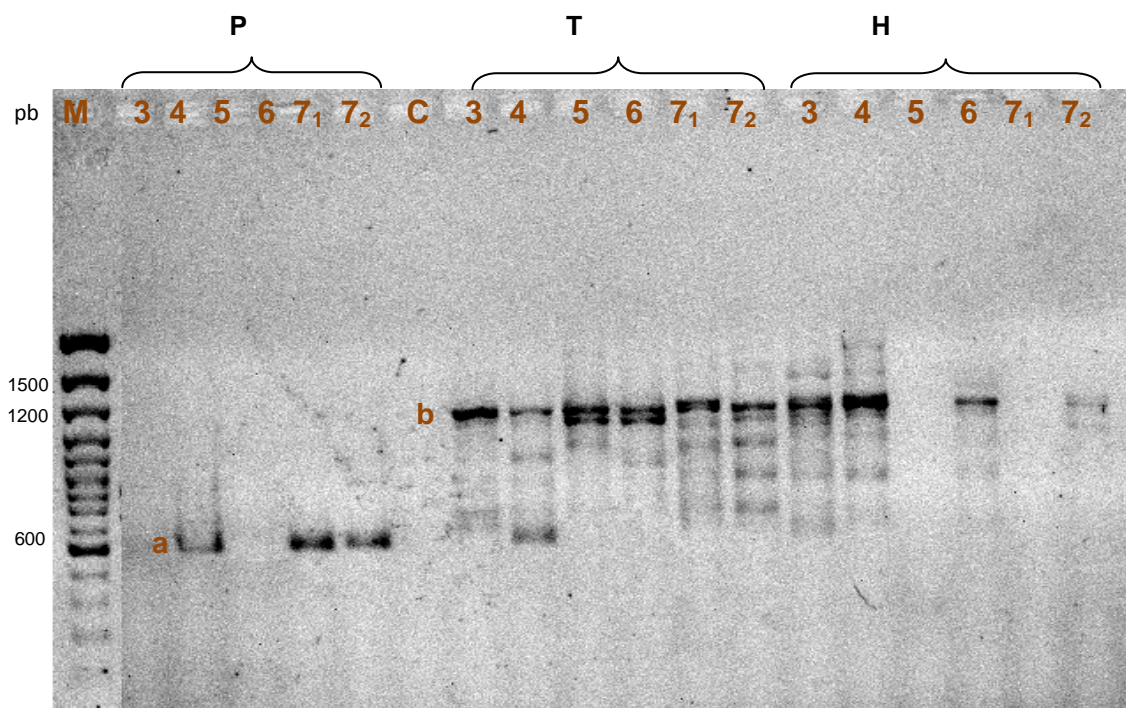


Figura 28 - Perfil electroforético obtido com RAPD-PCR (*Primer* OPA-10): 3,4,5,6,7₁,7₂ – Amostras; **P** – *Digitalis purpurea*; **T** – *Digitalis thapsi*; **H** – Híbrido; **M** – marcador GeneRuler™ 100 pb; **a** – 600 pb; **b** – 1500 pb.

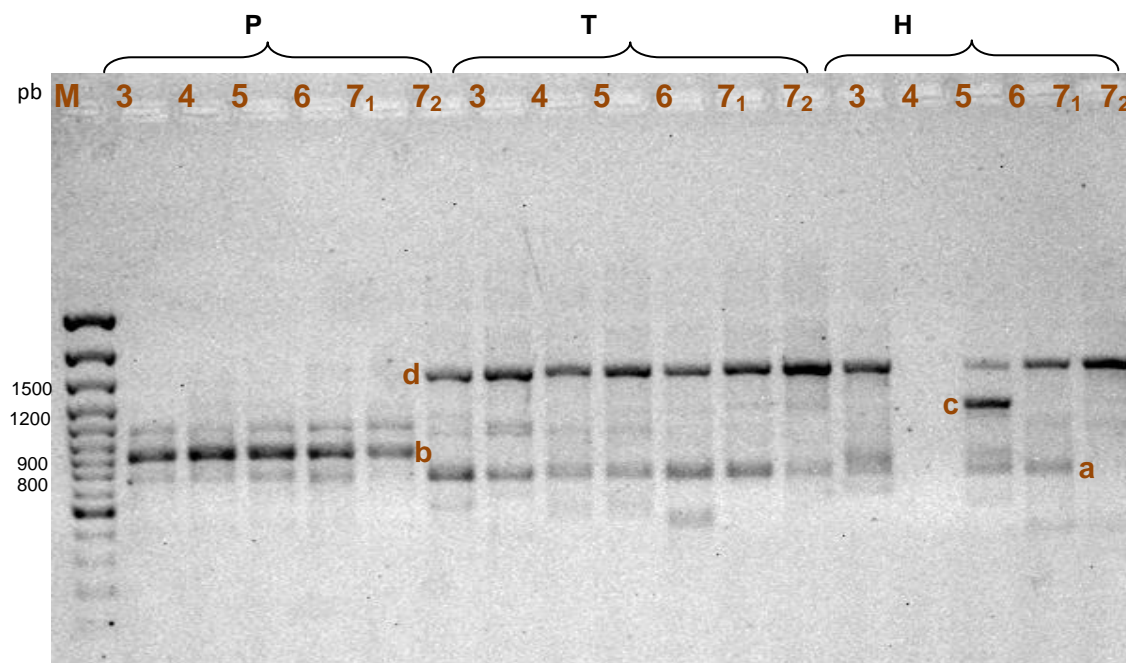


Figura 29 - Perfil electroforético obtido com RAPD-PCR (*Primer* OPB-7): **M** – marcador GeneRuler™ 100 pb; 3, 4, 5, 6, 7₁, 7₂ – Amostras; **P** – *Digitalis purpurea*; **T** – *Digitalis thapsi*; **H** – híbrido; **a**- 800 pb; **b** – 900 pb; **c**- 1200 pb; **d** – 1500pb.

Tabela 10 - Lista de primers revelando bandas de maior intensidade.

Primers	Bandas Totais	Tamanho Bandas (pb)
OPA-10	7	a600pb, b1500pb
OPB-7	9	a800pb, b900pb, c1200pb, d1500pb

pb- pares de bases; **a,b,c,d** – representação das bandas de maior intensidade.

Pela análise do dendograma para o *primer* OPB-7 (Fig. 30), é possível identificar à partida a presença de dois grupos. Um dos grupos é constituído por todas as amostras de *D. purpurea*, grupo I, e o outro, por amostras de *D. thapsi* e do híbrido, grupo II. Por sua vez, este último é formado por três subgrupos. O primeiro, IIa, que apresenta sete amostras, quatro de *D. thapsi* e três do híbrido. Os restantes grupos, IIb e IIc, apresentam cada um, duas amostras, uma de *D. thapsi* e uma do híbrido. O grupo de *D. purpurea* apresenta 7,5 % de semelhança com o grupo de *D. thapsi* e o híbrido. A semelhança entre as amostras de *D. purpurea* é de 100 %. Simultaneamente, verifica-se que o subgrupo IIa e IIb têm 50 % de semelhança com o subgrupo IIc. No subgrupo IIa a amostra Thapsi72 e Híbrido3 são 100 % semelhantes. Ao analisar o dendograma correspondente às matrizes de ambos os *primers* em estudo (Fig. 31), verifica-se também a divisão em dois grupos principais, o grupo I, correspondente a todas as amostras de *D. purpurea*, e o grupo II, constituído pelas amostras de *D. thapsi* e do híbrido. O grupo II divide-se em dois subgrupos, o subgrupo IIa, formado por nove amostras, cinco de *D. thapsi* e quatro do híbrido, o outro subgrupo IIb, apresenta duas amostras, uma de *D. thapsi* e uma do híbrido. O grupo I apresenta 5 % de semelhança com o grupo II.

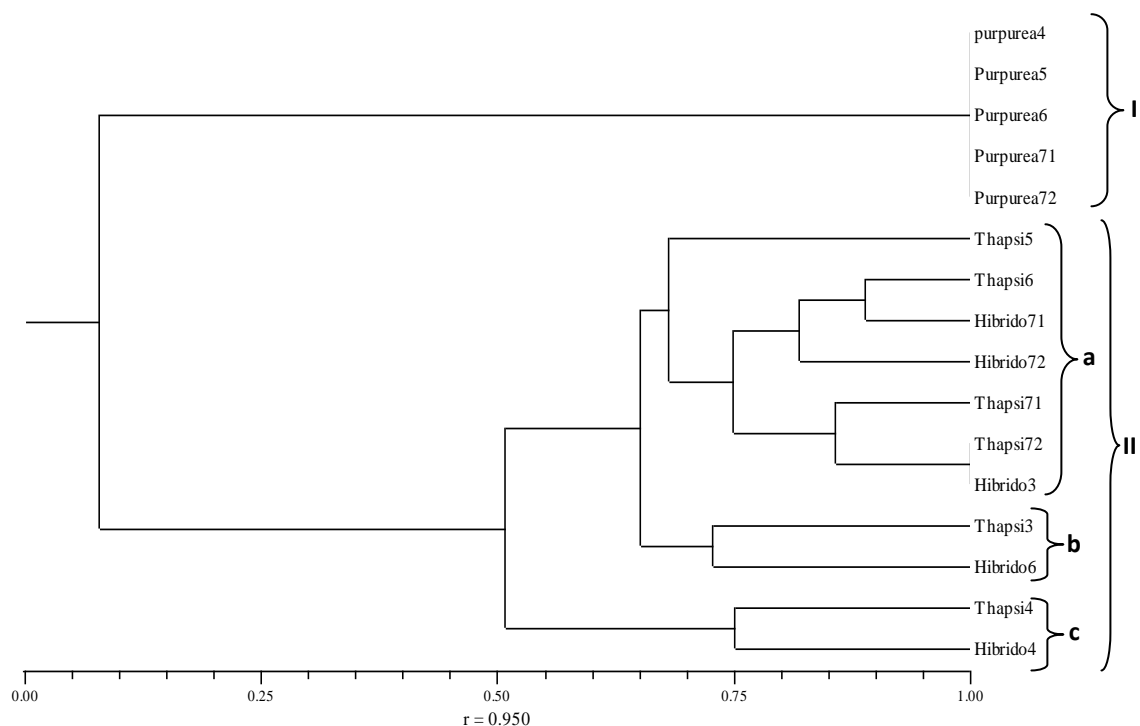


Figura 30 - Dendrograma (dos perfis PCR obtidos com o *primer* OPB-7) baseado no método do UPGMA aplicado à matriz de semelhança para o coeficiente de Dice (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,950$).

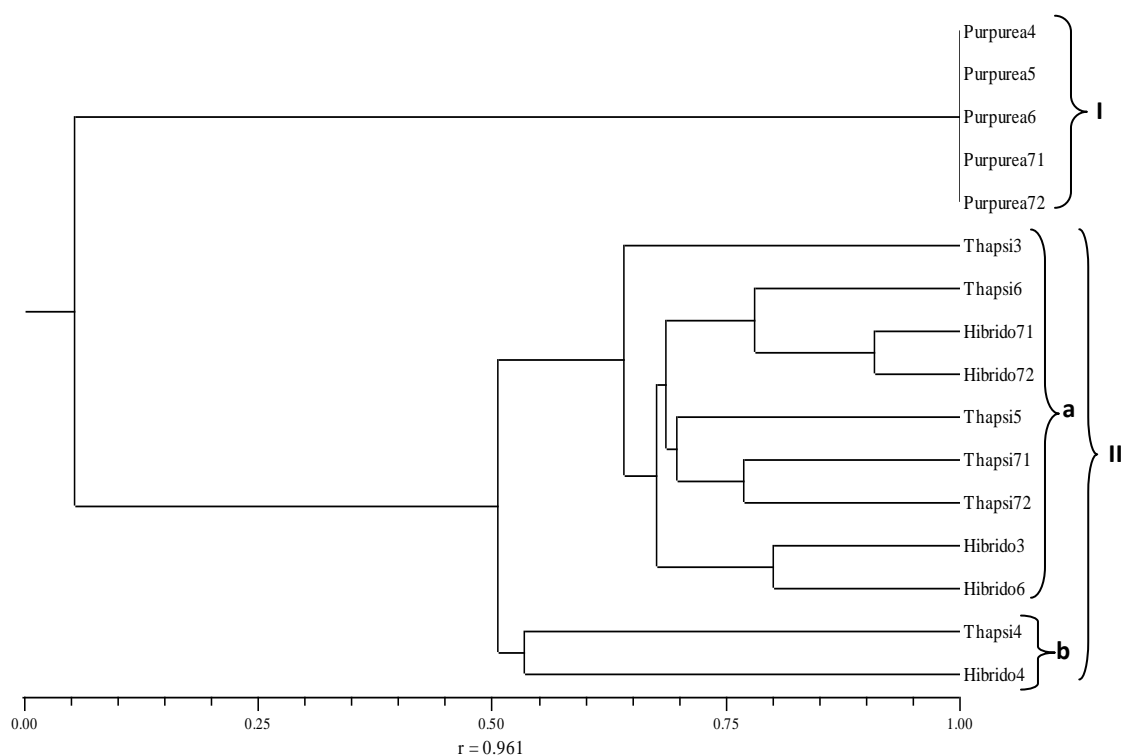


Figura 31 - Dendrograma (dos perfis PCR obtidos com os *primers* OPA-10 e OPB-7) baseado no método do UPGMA aplicado à matriz de semelhança para o coeficiente de Dice (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,961$).

5. Discussão

Na presente investigação, recorreu-se à técnica RAPD-PCR para avaliar a existência de hibridação natural entre *D. thapsi* e *D. purpurea*, de modo a determinar a origem do híbrido.

Foram utilizados dois *primers*, OPA-10 e OPB-7, que geraram bandas para análise da variabilidade genética das três espécies. Um estudo realizado por Nebauer e colaboradores (2000) com várias espécies de *Digitalis*, obteve um grande número de bandas polimórficas utilizando a mesma técnica e os referidos *primers*.

De acordo com Wolf e colaboradores (1999), a tecnologia RAPD aplicada a outras espécies medicinais evidenciou uma amplificação significativa de fragmentos polimórficos, mesmo com um número reduzido de *primers*.

Através do *primer* OPA-10 verificou-se a existência de uma banda de grande intensidade nos 1500 pb para *D. thapsi* e o híbrido. Para o mesmo *primer*, *D. purpurea* e *D. thapsi*, apresentam uma banda nos 600 pb, o que está de acordo com o estudo de Nebauer e colaboradores (2000).

Relativamente ao *primer* OPB-7, *D. thapsi* e o híbrido apresentam uma banda de grande intensidade nos 1500 pb. O híbrido apresenta ainda uma banda de grande intensidade nos 1200 pb. Para o referido *primer*, a banda de 800 pb está presente nas três espécies, o que poderá dever-se ao facto de pertencerem ao mesmo género. Parte-se do princípio que a presença de uma banda de ADN com igual migração nos três *taxa* em estudo é indicativa da partilha de características genéticas. No entanto, pode também corresponder a diferentes sequências de genes com igual número de pares de bases (Nebauer *et al.*, 2000).

Constatou-se a existência de variações dentro de amostras de *D. thapsi* e do híbrido, o que não se verificou para amostras de *D. purpurea*, pois ambos os *primers* revelaram um perfil monomórfico, não permitindo analisar variações dentro da espécie.

O híbrido foi o *taxon* que apresentou menor número de amostras amplificadas, o que reduziu o número de bandas para comparação com as outras espécies. Esta situação pode ter ocorrido devido a uma degradação de ADN, uma vez

que as amostras correspondentes ao híbrido se encontravam mais danificadas. Por outro lado, pode sugerir alguma diferença genética.

D. thapsi e o híbrido revelaram um perfil de amplificação muito semelhante para ambos os *primers*, diferenciando-se de forma clara do apresentado por *D. purpurea*. A acrescentar a este facto, a presença de uma banda nos 1500 pb apenas para *D. thapsi* e o híbrido, indica que ambas se encontram intimamente relacionadas.

O dendograma confirma a proximidade entre estas duas espécies, através do emparelhamento das suas amostras, e o seu afastamento relativamente à espécie *D. purpurea*. O *primer* OPB-7 revelou uma semelhança de mais de 65% entre *D. thapsi* e o híbrido.

Conclusões e Perspetivas

Nesta investigação foi realizada uma análise pormenorizada dos caracteres morfológicos a nível macroscópico e microscópico de duas espécies do género *Digitalis* L., *D. thapsi* L. (endemismo ibérico) e *D. purpurea* L., e de um exemplar considerado híbrido natural, entre ambas, para determinar as suas características identificativas. Simultaneamente, efetuou-se uma análise molecular através da técnica RAPD-PCR, para avaliar a sua variabilidade genética e o seu grau de parentesco, de modo a comprovar a hibridação natural entre *D. thapsi* e *D. purpurea*.

A nível macroscópico, conclui-se que a forma e o indumento do limbo foliar, bem como a morfologia do cálice e da corola, são os caracteres mais distintivos. No entanto, apesar da presença de características distintivas *à priori*, é possível identificar no híbrido características de ambas as espécies.

O híbrido apresenta folhas semelhantes às de *D. thapsi* no que diz respeito à forma e ao recorte do limbo. Ao nível do cálice, partilha o número de sépalas e a sua desigualdade com *D. purpurea*. Apresenta corola de coloração intermédia às outras espécies, com uma reentrância curvilínea próxima do cálice, que lhe confere um aspeto em S, tal como *D. thapsi*. Todas apresentam máculas internamente, mas apenas no híbrido é possível encontrar os dois tipos de máculas verificados nas outras espécies.

A nível microscópico conclui-se que as características mais distintivas estão associadas ao tipo e espessura da cutícula, ao número de camadas do parênquima em paliçada e lacunoso, à nervura principal e aos tricomas, apesar de também se poderem estabelecer analogias.

O híbrido apresenta uma cutícula reticulada e espessa em ambas as páginas, tal como acontece em *D. thapsi*. Manifesta um número de camadas intermédio ao das outras espécies para o parênquima em paliçada e partilha o mesmo número de camadas com *D. purpurea* para o parênquima lacunoso. Ao nível da nervura principal, apresenta maior abundância de tricomas secretores, eretos e livres, como os de *D. thapsi*. Ambas partilham tricomas secretores de pedicelo com 5-6 células e cabeça unicelular. Por outro lado partilha o mesmo tipo de tricomas tectores com *D. purpurea*.

Através da técnica RAPD-PCR conclui-se que o perfil electroforético de *D. thapsi* e do híbrido é muito semelhante, com a presença de bandas de igual peso molecular para ambos os *primers*.

Os resultados moleculares aproximam o híbrido de *D. thapsi*, com elevada percentagem de semelhança, ao mesmo tempo que afastam estas duas de *D. purpurea*.

Tendo em conta as abordagens levadas a cabo nesta investigação, conclui-se que estamos perante um híbrido natural resultante do cruzamento *D. thapsi* x *D. purpurea*, visto se constatar uma predominância dos caracteres de *D. thapsi*, juntamente com a sua proximidade genética, confirmada pelos resultados moleculares.

Propõe-se a continuação deste estudo com um maior número de amostras e a utilização de um maior número de *primers* para os marcadores RAPD. Verificar a homologia das bandas com o mesmo peso molecular, através da clonagem desses fragmentos e subsequente determinação da sua sequência nucleotídica.

Prosseguir os estudos químicos preliminares já realizados no laboratório de Farmacognosia, para analisar a composição e estrutura química dos compostos presentes nos híbridos. O seguimento deste estudo poderá revelar novas potencialidades a nível farmacológico, uma vez que tudo indica que os híbridos resultantes dos cruzamentos recíprocos entre *D. purpurea* e *D. thapsi*

apresentam maior conteúdo em heterósidos cardiotónicos, tal como sugerem os resultados apresentados por Angulo-Carpio (1964).

Realizar estudos de cruzamento controlado entre *D. thapsi* e *D. purpurea*, para obtenção de híbridos, de modo a confirmar as suas características morfológicas.

Os resultados obtidos com a aplicação da técnica RAPD-PCR no género *Digitalis* L., têm fornecido informações úteis para o estabelecimento de medidas de conservação. Neste sentido, a continuação deste trabalho, implica um estudo pormenorizado acerca da sua distribuição em território nacional, habitat e dinâmica populacional, de modo a avaliar o estado de conservação das espécies de *Digitalis* L. portuguesas, nomeadamente de *D. thapsi*, um endemismo Ibérico que, neste momento, se encontra sem qualquer estatuto de proteção.

REFERÊNCIAS

- Akhtar H (1993) *Medicinal plants and their cultivation*. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants.
- Ali M., Seyal M., Awan S., Niaz S., Ali S., Abbas A (2008) *Hybrid authentication in upland cotton through RAPD analysis*. Australian Journal of Crop Science 2(3):141-149.
- Angulo-Carpio M (1957) *Estudios cariológicos en espécies españolas del género Digitalis*. Genét. Ibérica 9: 163-222
- Angulo-Carpio M., De Rivera A (1964) *Estúdios preliminares sobre obtencion de híbridos interespecíficos entre Digitalis purpurea L. y Digitalis thapsi L.* Genét. Ibérica 16: 117.
- Aronson J (1987) *The discovery of the foxglove as a therapeutic agent*. Chemistry in Britain 23: 33.
- Boronnikova S., Kokaeva Z., Gostimsky S., Dribnokhodova O., Tikhomirova N (2007) *Analysis of DNA Polymorphism in a Relict Uralian Species, Large-flowered Foxglove (Digitalis grandiflora Mill.), Using RAPD and ISSR Markers*. Russian Journal of Genetics 43(5) 530–535.
- Braüchler C., Meimberg H., Heubl G (2004) *Molecular phylogeny of the genera Digitalis L. and Isoplexis (Lindley) Loudon (Veronicaceae) based on ITS- and trnL-F sequences*. Plant Syst. 248: 111–128.
- Buxton B, Newton C (1928) *Hybrids of Digitalis ambigua and Digitalis purpurea, their Fertility and Cytology*. Jom'n. of Gen. 18: 269-279.
- Castroviejo S., Benedí C., Rico E., Güemes J., Herrero A (2009) *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. 13: 341-357
- Cattell M., Karl S (2004) *Genetics and Morphology in Borrichia frutescens and B. arborescens (Asteraceae) hybrid zone*. American Journal of Botany 91(11): 1757–1766.
- Cirigliano M., Sun A (1998) *Advising patients about herbal therapies*. The journal of the American Medical Association. 280(18): 1565.
- Costa A (2002) *Farmacognosia*. Fundação Calouste Gulbenkian.Vol. 2: 302-326. 5ª ed.
- Coutinho A (1939) *Flora de Portugal (Plantas vasculares)*. Bertrand. Vol. 2.
- Cunha A (2005) *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. 446-451.
- Cunha A., Teixeira F., Silva A., Roque O (2007) *Aspectos históricos sobre o uso das plantas na terapêutica*. Plantas na terapêutica, farmacologia e ensaios clínicos. Fundação Calouste Gulbenkian.15-21
- Cunha A (2009) *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian.

Da Graça J (1967) *Digitalis thapsi* – Aspectos morfológicos, farmacodinâmico e químico de exemplares portugueses - Dissertação de candidatura ao título de Prof. Agregado da escola de farmácia da universidade de Lisboa.

Ferreira M, Grattapaglia D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília. 2ed. p220.

Elisiário P., Justo E., Leitão J (1999) *Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis*. Scientia Horticulturae 81 (1999) 287- 299.

Foglio M., Queiroga C., Sousa I., Rodrigues R (2006) *Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar*. MultiCiência

Fowler, M. W. (2006) *Review Plants, medicines and man*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86, 1797-1804.

Franco J. (1984) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). 2, Clethraceae-compositae*. Vol 2.

Frazão S., Serrano R., Maciag M., Szlajak A., Gomes E. T., Silva O (2008) *Evidence of natural hybridization on Portuguese Digitalis thapsi L.: Morphological and chemical characterization*. Planta Medica 74, 9: 1135 - 1135.

Fresquet J (2003) *Historia: La tradicion occidental en el uso de las plantas medicinales*. Fitoterapia Vademecum de prescripcion. 4ª ed. 57-77

Garret J., Silva P (1997) *Esquisso Historico da Farmacologia em Portugal*. Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Sociedade Portuguesa de Farmacologia.

Hadrys H., Balcik M., Schierwater B (1992) *Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology*. Mol. Ecol.1: 55-63.

Hegarty M., Hiscock S (2005) *Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies*. New Phytologist 165: 411 -423.

Jones W (1912) *Species Hybrids of Digitalis*. Journ of Gen. Vol 2: 71-88.

Júnior I.M (2005) *Avaliação de genótipos de Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial*. Campinas.

Kole C. (2011) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resouces Plantation and Ornamental Crops*. 73-112.

Lacerda D, Acedo M, Lemos Filho J, Lovato M (2002). *A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas*. Lundiana 3(2): 87-92.

Levin D., J. Ortega F., Jansen R (1996) *Hybridization and the extinction of rare plant species*. Conservation Biology 10: 10–16.

Life – Natureza No LIFE04/NAT/PT/000214. (2008) *Plano de Gestão para os Sítios de S. Mamede e Nisa/Lage da Prata*. Relatório Final.Vol. II. Link: http://www.nortenatur.cimaa.pt/Documentos/Listagem%20de%20Especies/Fichas_Flora_Final.pdf

- Ma Y., Milne R., Zhang C., Yang J (2010) *Unusual patterns of hybridization involving a narrow endemic Rhododendron species (Ericaceae) in Yunnan, China*. American Journal of Botany 97(10): 1749–1757.
- Martinez L (1946) *Contribuição al estudio histológico comparado de las Digitales españolas*. Farmacognosia. 4(8): 75-79.
- Mendes M (2007). *Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal*. Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Vegetal.
- Metcalf C., Chalk L (1950) *Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication. 1:165 e 724.
- Metcalf C., Chalk L (1979) *Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication. 2ª Ed. 1: 97-165.
- Meza A (2002) *Construção de um mapa genético para híbridos interespecíficos de variedades comerciais de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) empregando-se marcadores moleculares do tipo RFLP*. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo
- Moreira P (2004) *Análise de Marcadores Moleculares RAPD em Espécies dos Gêneros Eumops, Molossus, Eptesicus, Myotis e Artibeus (Chiroptera, Mammalia)*. São José do Rio Preto – SP
- Nebauer SG, del Castillo-Agudo L, Segura J (1999) *RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (Digitalis obscura L.)*. Theor Appl Genet 98: 985–994
- Nebauer S.G., del Castillo-Agudo L, Segura J (2000) *An assessment of genetic relationships within the genus Digitalis based on PCR-generated RAPD markers*. Theor Appl Genet 100:1209–1216
- Olmstead R., DePamphilis C., Wolfe A., Young N., Elisons W., Reeves P. (2001) *Disintegration of the Scrophulariaceae*. Amer. J. Bot. 88(2): 348–361.
- Pérez-Alonso N., Wilken D., Gerth A., Jähn A., Nitzsche HM., Kerns G., Capote-Perez A., Jiménez E., (2009) *Cardiotonic glycosides from biomass of Digitalis purpurea L. cultured in temporary immersion systems*. Plant Cell Tiss Organ Cult 99:151–156
- Ramos R., Cruz P., Martinho S (2010) *Catálogo de Plantas*. Instituto Superior de Ciências da Saúde.
- Regnart H (1935) *Studies of Hybrids in the Genus Digitalis. I The cytology of a sterile hybrid between D. dubia and D. purpurea*. Genetics 17: 145-153.
- Rieseberg L., Ellstrand N (1993) *What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization?*. Crit Ver Plant Sci 12: 213-241.
- Rieseberg L (1997) *Hybrid origins of plant species*. Annual Review of Ecology and Systematics 28: 359–389.
- Rhymer J., Simberloff D (1996) *Extinction by hybridization and introgression*. Annual Review of Ecology and Systematics 27: 83–109.

Sales E., Nebauer S., Mus M., Segura J (2001). *Population Genetic Study in Balearic Endemic Plant Species Digitalis minor (Scrophulariaceae) using RAPD markers*. American Journal of Botany 88(10): 1750–1759.

Sampaio G (1919) *Flora Portuguesa*. Fac-Souile, Instituto Nacional de Investigação Científica. 4ed.

Santos J (1994). *Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas*. Horticultura Brasileira, Brasília, 12(2):282-286.

Serrano R., Silva O., Gomes E. T (2006) *Botanical studies on Digitalis thapsi L. an endemic iberism*, Trabalho apresentado em XLI Congress of the Portuguese Society for Microscopy, In XLI Congress of the Portuguese Society for Microscopy, Braga.

Serrano R., Silva O., Nóbrega F., Afonso A., Rozeira C., Rodrigues F., Arrais J., Filipe M., Vidal R., Gomes E.T (2004) *Comparative study of Digitalis L. species from Portuguese flora*, Trabalho apresentado em International Congress on Natural Products Research: A Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA and PSE, In International Congress on Natural Products Research: A Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA and PSE Program and Abstracts, Phoenix (Arizona).

Smith J., Charles C., Wagner B., Wagner W (1996) *Interspecific hybridization in natural populations of Cyrtandra (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: Evidence from RAPD markers*. Plant Systematics and Evolution 200 (1,2): 61-77.

Sneath P., Sokal R (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco.

Sokal, R., Rohlf F (1962) *The comparison of dendrograms by objective methods*. Taxon. 11:33-40.

Souza C (2006) *“Dna Fingerprint” Via Marcadores RAPD e Avaliação da Divergência Genética em Genótipos de Bananeira (Musa spp.)*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Stace C (1989) *Plant Taxonomy- Biosystematics*. Cambridge University Press, Cambridge. 2ª Ed. 67-85.

Valdir F., Junior V., Pinto A (2005) *Plantas Medicinais: Cura Segura*. Vol. 28(3): 519-528.

Videira A (2001) *Engenharia Genética: Principios e Aplicações*. Lidel (6): 46-70

Welsh J., McClelland M (1990) *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic Acids Research 18(24): 7213-7218.

Wolf H., Zundorf I., Winckler T., Bauer R., Dingermann T (1999) *Characterization of Echinaceae species and detection of possible adulterations by RAPD analysis*. Planta Medica 65: 773-774.

Zhu X., Li Y., Wu G., Fang Z., Li Q., Liu J (2009). *Molecular and Morphological evidence for natural hybridization between Primula secundiflora Franchet and P.poissonii Franchet (Primulaceae)*. Polish Academy of Sciences and Jagiellonian University.

IMAGENS

[1]http://www.s bq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Historias_Interessantes_de_Produtos_Naturais08.pdf

[2] http://2.bp.blogspot.com/_VChInV7tA7o/TBKLxIDdkGI/AAAAAAAAA8Y/_Kje-Rh3pYo/s1600/Illustration_Digitalis_purpurea0.jpg

[3]http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=Ni89OPVCNKm6uMgSbbD-_6LVhqD0uzVdr0mVRNwJhz4HquMIMp0UL9dTUaMXBhVk9jYGd0Egjxk5uvPRyFF7LA==

[4] <http://www.flora-on.pt/#/1digitalis+purpurea>

[5] <http://www.flora-on.pt/#/1digitalis+thapsi>

[6]http://aguiar.hvr.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_esp2.asp?especie=Digitalis+purpurea&Submit2=Pesquisar&ID=992

[7]http://aguiar.hvr.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_esp2.asp?especie=Digitalis+thapsi&Submit2=Pesquisar&ID=993

Anexo A

Kit Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

1. Macerou-se cerca de 100 mg de material vegetal, com azoto líquido, num almofariz. Transferiu-se o macerado para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
2. Adicionaram-se 400 µl de tampão de lise AP1 e logo de seguida 4 µl de Rnase A, submetendo o tubo ao vortex.
3. Incubou-se a mistura durante 10 minutos no banho seco a 65°C. Misturou-se 2 a 3 vezes o tubo Eppendorf, por inversão.
4. Adicionou-se 130 µl de tampão AP2, misturou-se e incubou-se durante 5 minutos no gelo.
5. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 minutos.
6. Colocou-se uma coluna “QIAshredder mini spin column” num tubo de 2 ml e aplicou-se o sobrenadante à coluna. Centrifugou-se durante 2 minutos a 14000 rpm.
7. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo Eppendorf.
8. Adicionou-se 1,5 volumes de AP3/E e misturou-se com a pipeta
9. Colocou-se uma coluna “Dneasy mini spin column” num tubo de 2 ml e transferiu-se 650 µl do tubo de Eppendorf para a coluna. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o sobrenadante. Repetiu-se este passo com o resto da amostra.
10. Transferiu-se a coluna “Dneasy mini spin column” para um novo tubo de Eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem AW. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o sobrenadante.
11. Adicionou-se novamente 500 µl de tampão AW à coluna e centrifugou-se a 14000 rpm durante 2 minutos.
12. Centrifugou-se uma terceira vez, sem tampão de lavagem, durante 1 minuto, a 14000 rpm.
13. Transferiu-se a coluna para um tubo de Eppendorf de 1,5 ml, e eluiu-se o DNA com 100 µl de tampão AE pré-aquecido (65°C). Incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos, e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto.